

---

# **Charakterisierung magnetischer Nanopartikel für die Diagnostik und Therapie**

Dissertation

**Zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem

Rat der Medizinischen Fakultät der **Friedrich – Schiller – Universität Jena**

Von **Timm Sakrzewa**, geboren am 28.01.1977 in Heilbronn

---

Gutachter

1. ....
2. ....
3. ....

Tag der öffentlichen Verteidigung: .....

---

## Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Symbole und Abkürzungen	7
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>8</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>10</b>
2.1 Historischer Überblick	10
2.2 Allgemeiner Stand der Literatur und Zielsetzungen	16
<b>3 Ziele der Arbeit</b>	<b>23</b>
<b>4 Arbeitsutensilien</b>	<b>24</b>
4.1 Materialien und Chemikalien	24
4.2 Geräte	25
<b>5 Methoden</b>	<b>26</b>
5.1 Immobilisierung von Antikörpern an magnetischen Nanopartikeln	26
5.1.1 Charakterisierung der magnetischen Nanopartikel	26
5.1.2 Kopplung von Antikörpern an magnetische Nanopartikel	27
5.2 Abtrennung nicht gebundener Antikörper	28
5.2.1 Abtrennung überschüssiger Antikörper mittels eines Dauermagneten	28
5.2.2 Abtrennung überschüssiger Antikörper mittels Gelfiltration	29
5.2.3 Abtrennung überschüssiger Antikörper mittels Teilchengrößenseparation	31
5.3 Lyophilisation magnetischer Nanopartikel	32

---

<b>5.4</b>	<b>Bestimmung der Menge an gebundenen Antikörpern</b>	<b>33</b>
5.4.1	Grundprinzip der Proteinbestimmung nach Bradford	33
5.4.2	Experimentelle Durchführung	33
<b>5.5</b>	<b>Teilchengrößenmessung magnetischer Nanopartikel mittels Laserdiffraktometrie</b>	<b>34</b>
5.5.1	Grundlagen der angewandten Messmethode	34
5.5.2	Messprinzip und Messanordnung	35
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
<b>6.1</b>	<b>Einfluss der Temperatur auf das Aggregationsverhalten von magnetischen Nanopartikeln</b>	<b>37</b>
6.1.1	Native magnetische Nanopartikel	37
6.1.2	Funktionalisierte magnetische Nanopartikel	40
<b>6.2</b>	<b>Einfluss der Lyophilisierung auf die Teilchengröße nativer magnetischer Nanopartikel</b>	<b>43</b>
<b>6.3</b>	<b>Lagerung nativer und funktionalisierter magnetischer Nanopartikel</b>	<b>46</b>
<b>6.4</b>	<b>Tauglichkeit verschiedener Verfahren zur Abtrennung ungebundener Antikörper</b>	<b>49</b>
<b>6.5</b>	<b>Einfluss verschiedener Antikörperkonzentrationen auf funktionalisierte magnetische Nanopartikel</b>	<b>53</b>
6.5.1	Auswirkungen auf die Teilchengrößenverteilung funktionalisierter magnetischer Nanopartikel	53
6.5.2	Einfluss auf die Antikörper-Bindungskapazität funktionalisierter magnetischer Nanopartikel	56

---

<b>6.6</b>	<b>Einfluss der Menge an Kopplungsreagenz auf die Funktionalisierung magnetischer Nanopartikel mit Antikörpern</b>	<b>57</b>
6.6.1	Auswirkung auf die Teilchengröße funktionalisierter magnetischer Nanopartikel	57
6.6.2	Einfluss auf die Antikörper-Bindungskapazität funktionalisierter magnetische Nanopartikel	61
<b>6.7</b>	<b>Die Protein-Bindungskapazität magnetischer Nanopartikel in Abhängigkeit von der Antikörperinkubationszeit</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Diskussion</b>	<b>63</b>
<b>7.1</b>	<b>Einfluss der Temperatur auf das Aggregationsverhalten von magnetischen Nanopartikeln</b>	<b>63</b>
7.1.1	Native magnetische Nanopartikel	63
7.1.2	Funktionalisierte magnetischen Nanopartikeln	64
<b>7.2</b>	<b>Einfluss der Lyophilisierung auf die Größe nativer magnetischer Nanopartikel</b>	<b>65</b>
<b>7.3</b>	<b>Lagerung nativer und funktionalisierter magnetischer Nanopartikel</b>	<b>66</b>
<b>7.4</b>	<b>Tauglichkeit verschiedener Verfahren zur Abtrennung ungebundener Antikörper</b>	<b>68</b>
<b>7.5</b>	<b>Einfluss verschiedener Antikörperkonzentrationen auf funktionalisierte magnetische Nanopartikel</b>	<b>72</b>
<b>7.6</b>	<b>Einfluss der Menge an Kopplungsreagenz auf die Funktionalisierung magnetischer Nanopartikel mit Antikörpern</b>	<b>74</b>
<b>7.7</b>	<b>Die Protein-Bindungskapazität magnetischer Nanopartikel in Abhängigkeit von der Antikörperinkubationszeit</b>	<b>76</b>

---

<b>8</b>	<b>Schlussfolgerungen der Arbeit</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>89</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>90</b>
<b>12</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>91</b>

---

## Verzeichnis der verwendeten Symbole und Abkürzungen

Abb	<b>A</b> bbildung
Ak	<b>A</b> ntikörper
BSA	<b>b</b> ovine <b>s</b> erum <b>a</b> lbumin (Rinderserumalbumin)
DNS	<b>D</b> esoxyribonucleinsäure
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid- hydrochlorid
K	<b>K</b> elvin
mbar	<b>M</b> illibar
mg	<b>M</b> illigramm
ml	<b>M</b> illiliter
MNP	<b>m</b> agnetische <b>N</b> anopartikel
MRT	<b>M</b> agnetresonanztomographie
PBS	<b>P</b> hosphate <b>b</b> uffered <b>s</b> aline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, isotonisch)
Min.	<b>M</b> inuten
P	<b>P</b> ascal
$\Delta p$	Dampfdruck
Std.	<b>S</b> tunden
Tab	<b>T</b> abelle
$\Delta T_b$	Siedepunkt
$\Delta T_f$	Gefrierpunkt
$T_r$	<b>T</b> ripelpunkt
U	<b>U</b> mdrehungen
$\mu g$	Mikro <b>g</b> ramm
$\mu l$	Mikro <b>l</b> iter

---

## 1 Zusammenfassung

Mit Hilfe der Nanotechnologie wird heute daran geforscht, Werkzeuge zu erschaffen, die es ermöglichen, minimalinvasiv auf den menschlichen Körper einzuwirken. Eines dieser Werkzeuge sind magnetische Nanopartikel. Diese Partikel bestehen aus einem Kern aus Eisenoxid, welcher von einer Hüllschicht aus Dextran umgeben ist. Diese Hüllschicht hält die Partikel in einem hydrodynamischen Schwebezustand, dient als Anbindungsstelle für Liganden und sorgt dafür, dass die Teilchen biokompatibel sind. Sie finden inzwischen bei vielen biomedizinischen Verfahren ihre Anwendung, wobei bisher nur der Einsatz im MRT etabliert ist. Weitere mögliche Einsatzbereiche sind als Kontrastmittel in der Ultraschalldiagnostik, als Trägermaterial beim so genannten *Drug Targeting* und die Anwendung im Rahmen der Hyperthermie - und Thermoablationstherapie hervorzuheben.

Kommen magnetische Nanopartikel bei den genannten Anwendungsbereichen zum Einsatz, so ist es von Vorteil, sie z.B. mit einem Antikörper zu verbinden und es somit zu ermöglichen, dass die Nanopartikel nach Applikation in die Blutbahn durch eine Antigen/Antikörperreaktion gezielt zu ihrem Zielort finden. Die Anbindung von Antikörpern an magnetische Nanopartikel stellt den Inhalt vieler Forschungsansätze dar. Es wird untersucht, wie eine ausreichende und zuverlässige Verbindung von Antikörper zu Nanopartikel zu erreichen ist. Hierbei dürfen die entstehenden Komplexe eine bestimmte Größe nicht überschreiten, da sonst eine sichere Durchgängigkeit durch Blutgefäße nicht mehr sichergestellt ist.

Die vorliegende Arbeit untersucht das Verhalten von magnetischen Nanopartikeln, welche als Sonden einer hochselektiven Technologie dienen, charakterisieren und ermitteln wie Funktionalisierungsreaktionen effektiver durchgeführt werden können. Wichtige Parameter hierfür sind: die Temperatur, der Einsatz der Lyophilisation, die Lagerungszeit, die verwendeten Reinigungsverfahren, die Menge der zugegebenen Antikörper und Kopplungsreagenzien sowie die Antikörperinkubationszeit.

So konnte gezeigt werden, dass eine Exposition nativer magnetischer Nanopartikel bei Temperaturen von 40°C und 60°C nicht zu einer Vergrößerung der Teilchendurchmesser führt. Im Gegensatz dazu ergaben dieselben Temperaturen bei funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln eine deutliche Zunahme der Partikeldurchmesser. Gerade im Zuge von Hyperthermie – und



---

Thermoablationsbehandlungen heißt dies, dass zur Vermeidung von Nebenwirkungen, z.B. Embolien, die Möglichkeit von Agglomeraten besonders beachtet werden muss. Ob dies auch in vivo zutrifft müssten weitere Studien zeigen. Die Lyophilisation wird in der Pharmazie mit Erfolg zur Einengung von Proteinen genutzt und erschien deshalb auch bei Nanopartikeln einsetzbar. Um Suspensionen aus magnetischen Nanopartikeln aufzukonzentrieren, wurde das Verfahren der Lyophilisation untersucht. Allerdings führte sie zu sehr großen Partikelagglomerationen, wodurch sie sich als nicht anwendbar erwies.

Es zeigte sich, dass eine Lagerung über einen Zeitraum von fünf Monaten bei nativen magnetischen Nanopartikeln ohne weiteres möglich ist. Wohingegen funktionalisierte magnetische Nanopartikel eine Vergrößerung der Teilchendurchmesser zeigten, die es notwendig macht, diese zügig nach der Kopplungsreaktion zu verbrauchen.

Um nicht erwünschte Bestandteile nach der Kopplungsreaktion aus der Suspension abzutrennen, wurden die Gelfiltration, die Teilchengrößenseparation und eine Reinigung mittels eines Dauermagneten überprüft. Einzig bei einer Waschung mit Hilfe des Dauermagneten erfolgte keine Agglomeratbildung.

Um die Anbindung von Antikörpern an magnetische Nanopartikel zu optimieren wurde ermittelt, bei welcher Antikörperkonzentration und Menge an einem Kopplungsreagenz die entstandenen funktionalisierten magnetischen Nanopartikel eine optimale Antikörpersättigung und Größe zeigten. Eine verwendete Antikörpermenge von 1,0 mg/ml erwies sich ideal, um eine Sättigung der magnetischen Nanopartikel zu erreichen ohne dass es zu Agglomeraten kommt. Als geeignete Menge an Kopplungsreagenz haben sich 8 mg EDC pro Ansatz herausgestellt. Eine vermehrte Zugabe des Kopplungsreagenz erwies sich nicht sinnvoll, da sie zu Agglomeraten bei keiner signifikanten Erhöhung der Antikörperanbindung führte. Eine Variation der Antikörperinkubationszeit zeigte deutlich, dass, um eine optimale Ausbeute an gekoppelte Antikörpern zu erhalten, die Antikörperinkubationszeit keinesfalls unter 180 Minuten gewählt werden sollte.

Durch die hier ermittelten Ergebnisse ist der Einsatz von magnetischen Nanopartikeln in Forschung, Diagnostik und Therapie in Zukunft vorhersehbarer. Da bei zukünftigen Studien besser auf das Aggregationsverhalten magnetischer Nanopartikel eingegangen werden kann und nun ein überprüftes und optimiertes Funktionalisierungsprotokoll vorliegt.

---

## **2 Einleitung**

### **2.1 Historischer Überblick**

Die Nanotechnologie hat sich zum Ziel gesetzt, neue Materialien, Geräte und Systeme zu erforschen und nutzbar zu machen, welche sich durch vielfältige Funktionen und Möglichkeiten auszeichnen, die entweder in ihrer Größe oder in materialspezifischen Eigenschaften der Nanostrukturen begründet liegen. Das Präfix „Nano“ steht für eine Größenordnung die den Millionsten Teil eines Millimeters ausmacht. Viele ehrgeizige Vorhaben der vergangenen Jahrzehnte wurden bereits realisiert, wohingegen andere wiederum noch eher in den Bereich der „Science Fiction“ einzuordnen sind. Von einer fast schon utopischen Idee ist die Nanotechnologie in den letzten Jahrzehnten zu einem anerkannten und innovativen Forschungsgebiet herangereift. Ein Forschungs- und Anwendungsgebiet das interdisziplinär wohl kaum betrieben werden könnte. Weltweit arbeiten Forschergruppen an neuen Werkstoffen und Möglichkeiten zum Einsatz der bereits bestehenden Materialien. Die Nanotechnologie eröffnet weit gefächerte Möglichkeiten in der Materialforschung, in der biologischen, physikalischen und chemischen Technologie, sowie in der Pharmazie und Medizin. Das Ziel der Nanobiotechnologie im Allgemeinen stellt eine Verbindung zwischen der Forschung und der technischen Nutzung an biologischen und nicht biologischen Systemen dar. Aufgrund der starken interdisziplinären Verflechtung, steht die Nanobiotechnologie direkt an der Schnittstelle zwischen Biochemie und Biophysik. Hierbei beschäftigt sich die Biochemie eher mit Materialaspekten und die Biophysik mit methodischen, strukturanalytischen Aspekten. Die Biotechnik bzw. Nanotechnik liefert für die Nanobiotechnologie die zur Herstellung von Kleinstbauteilen nötigen Methoden. Darunter fällt z. B. die Isolierung von funktionellen Biomolekülen, genetische Verfahren für die Konstruktion bzw. Analyse spezifischer DNS-Moleküle oder die Erzeugung von Nanopartikeln und –strukturen, sowie deren Anbindung an biologische Strukturen (VDI Technologiezentrum, 2002).

Die Nanobiotechnologie und die Materialforschung begegnen sich bei der Herstellung und Erforschung von möglichen Anwendungen von Nanopartikeln. Nanopartikel sind Teilchen, die aus einigen wenigen bis mehreren hundert Atomen

---

oder Molekülen bestehen. Sie sind also zwischen 5 und 200 nm groß (Niemeyer, 2001). Erstmals gelang es in den frühen 60er Jahren magnetische Nanopartikel herzustellen, die dann für einen begrenzten Zeitraum auch in einer Flüssigkeit, ohne Zerfall oder Ausfallen, stabil blieben (Rosensweig, 1982). Wie so oft in der Forschung, sind uns hier zahlreiche Mikroorganismen weit voraus, denn die von Mikroorganismen schon seit Urzeiten produzierten magnetischen Nanopartikel sind unseren im Labor synthetisierten immer noch weit überlegen (Rosensweig, 1982). Magnetische Nanopartikel mit natürlichem Ursprung konnten 1962 erstmals von *Lowenstam* nachgewiesen werden und zwar in den Zähnen der Zungenplatte von Meeresweichtieren (Lowenstam, 1962). 1975 entdeckte *Blakemore* gram-negative Prokaryonten, welche die Fähigkeit besitzen, feine (50 - 100 nm), intrazelluläre membrangebundene, ferromagnetische, kristalline Partikel herzustellen (Schüler et Frankel, 1999). Neben diesen intrazellulär magnetische Nanopartikel produzierenden Bakterien ist auch eine Vielzahl von weiteren Mikroorganismen bekannt, die extrazellulär magnetische Nanopartikel synthetisieren, wie z.B. verschiedene Algenarten (Zhang et al, 1998). Diese Partikel sind mit einer intrazellulären Phospholipid-Membran umgeben und bilden so die so genannten Magnetosomen (Schüler et Frankel, 1999). Solche Partikel können aus den herstellenden Bakterien gewonnen werden. Nach Zerstörung der Zellwände der Bakterien werden mittels magnetischer Separation die Nanopartikel abgetrennt und können idealerweise dann für verschiedene biomedizinische Applikationen, wie z. B. Drug targeting, Hyperthermie -und Thermoablations-Behandlung (eingehende Erklärungen erfolgen weiter unten), verwendet werden, da sie aufgrund der sie umgebenden Lipidschicht biokompatibel sind, kaum zu Agglomeration neigen und sich gut eignen um mit weiteren Substanzen modifiziert zu werden (Matsunaga et al, 2000).

Künstliche magnetische Nanopartikel sind meist als magnetische Flüssigkeiten (Ferrofluide) verfügbar und werden bereits in vielen technischen Bereichen eingesetzt, z. B. in der Computerindustrie, Laustsprechertechnik und Messtechnik (Raj et al., 1995). Als biokompatible magnetische Ferrofluide sind Anwendungen in der Biotechnologie bzw. Medizin und Pharmazie vorstellbar und auch schon einsetzbar (Rosensweig, 1982). So werden magnetische Nanopartikel als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie eingesetzt (Stark et al., 1988, Lanza et al., 2003). In der Tumorbehandlung ermöglichen magnetische Nanopartikel

---

Therapieansätze, wie Hyperthermie- und Thermoablationsbehandlung der Tumoren. Hierbei werden Tumoren durch die Wärmeentwicklung der Nanopartikel in einem hochfrequenten Magnetwechselfeld geschädigt (Gordon et al., 1979, Shinkai et al., 1994). Ein weiteres Verfahren, welches in der Medizin eingesetzt wird, wird als *drug targeting* bezeichnet, wobei mit Hilfe von Magneten Wirkstoffe, welche an die magnetischen Nanopartikel gebunden sind, an den gewünschten Einsatzort im Körper gebracht werden (Alexiou et al., 2001).

Die oben erwähnten magnetischen Nanopartikelsuspensionen bestehen aus magnetischen Eisenoxidnanopartikeln mit einem Partikeldurchmesser von ungefähr 10 nm, wobei es noch kleinere Nanopartikel gibt. Das Suspensionsmittel ist entweder polar oder unpolar. Diese Partikel sind superparamagnetisch, d. h. sie reagieren in magnetischen Feldern durch Umkehrung des magnetischen Vektors, behalten aber keinen Restmagnetismus nachdem das Magnetfeld deaktiviert wurde. Die ersten Ferrofluide wurden hergestellt, indem man magnetische Partikel von Mikrometer Größe gemahlen hat (Berkovski et al., 1996). Heute erfolgt die chemische Synthese von Ferrofluiden meist über nasschemische Ausfällung von Eisen und eisenhaltigen Salzen mit Hilfe von alkalischen Lösungen und unter Behandlung unter hydrothermalen Bedingungen (Berkovski et al., 1996). Üblicherweise wird bei biokompatiblen Ferrofluiden Wasser als Suspensionsmedium genutzt. Durch Ioneninteraktionen wird erreicht, dass die magnetischen Nanopartikel im Wasser stabil bleiben und Agglomerationen verhindert werden (Massart, 1981, Berger et al., 1999). Hierzu wird eine Doppelschicht eines *surfactant* aus z. B. Fettsäuren (Shen et al., 1999), Aspartin- und Glutaminsäuren (Sousa et al., 2001), Citrate (Domingo et al., 2001), Peptide (Tiefenauer et al., 1993) usw. verwandt. Ebenso können die Eisenionen unter Anwesenheit von Polymeren, wie z. B. Dextran oder Polyvinylalkohol, ausgefällt werden, die daraufhin die magnetischen Nanopartikel umhüllen und diese in Suspension halten (Molday et al., 1982, Pardoe et al., 2001). Neben dem Nutzen, dass die Partikel vor Aggregationen geschützt werden, stellen diese Ummantelungen mit Dextran oder Polyvinylalkohol auch eine Möglichkeit dar, andere Substanzen, wie z. B. Antikörper, an den Partikeln zu immobilisieren. Eine Herstellung magnetischer Nanopartikel mit Hilfe von Wasser – in - Öl Mikroemulsionen (umgekehrte Mizelle) ermöglicht eine gute Kontrolle über die Größe und Gestalt der Partikel. Eine solche umgekehrte Mizelle ermöglicht auch eine

---

fortgesetzte Herstellung der magnetischen Nanopartikel, um so, wie bei einer Muschelperle, eine wachsende und gleichmäßige Struktur zu erhalten (Seip et al., 1998, Šafařík et Šafaříková, 2002; Seip, 1999; O'Connor et al, 2001).

Die magnetischen Nanopartikel dürfen für spätere Anwendungen eine gewisse Größe nicht überschreiten. So sollten die durchschnittlichen hydrodynamischen Teilchendurchmesser klein genug sein, um nach Injektion in die Blutbahn dort zu verbleiben und eine Durchgängigkeit durch das Kapillarsystem zu gewährleisten, damit Embolien vermieden werden. Ihre Eisenkerne müssen über eine ausreichend hohe Fähigkeit zur Magnetisierung verfügen, damit von außen einwirkende Magnetfelder die Partikel gegen den Blutstrom bewegen und fixieren können (z. B. beim *drug targeting*). Auch die durch hochfrequenten Magnetfelder hervorgerufene Wärmeproduktion muss so hoch sein, dass bei Anwendungen wie Hyperthermie und Thermoablation die vorgegebenen Temperaturbereiche erreicht werden. Die Hüllschicht der magnetischen Nanopartikel muss aus einem Material bestehen, welches zum einen die Anbindung von Liganden, wie z. B. Antikörpern, gewährleistet, und zum anderen biokompatibel ist (Tartaj et al., 2003).

Es gibt zahlreiche verschiedene magnetische Nanopartikel, die für eine ebenso große Anzahl an Anwendungsmöglichkeiten in der Biotechnologie verwendet werden. Die Immobilisierung von Enzymen, Antikörpern, Oligonukletiden und anderen bioaktiven Substanzen stellt hierbei eine wichtige Voraussetzung dar. So wird es mit dem so genannten *Drug targeting* möglich, dass die immobilisierten Komponenten ihre Wirkung an ganz bestimmten Orten oder Vorgängen entfalten. Mögliche Probleme (z.B. Nebenwirkungen an anderen Organen), die mit einer systemischen Gabe von Wirkstoffen verbunden sind, können so umgangen werden. Dies geschieht dadurch, dass z. B. die mit einem Wirkstoff gebundenen magnetischen Nanopartikel in ein das Zielorgan versorgendes Gefäß eingebracht werden und mit einem von außerhalb des Körpers aktiven Magnetfeld zu dem gewünschten Zielort hingeführt bzw. dort festgehalten werden (Widder et Senyei, 1983, Torchilin, 2000).

Weitere Anwendungsmöglichkeiten magnetischer Nanopartikel stellen Verfahren und Methoden als eine Alternative zu den zeitaufwendigen chromatographischen Trennverfahren dar. So können mit dem entsprechenden Liganden gekoppelte

---

magnetische Nanopartikel eingesetzt werden, um Zell - oder Proteingemische von ungewünschten Bestandteilen zu trennen. Werden herkömmliche Immunassays mit magnetischen Nanopartikeln ergänzt, kann die Bestimmung einer Vielzahl von biologisch aktiven Komponenten verbessert werden. Hierbei werden meist Antikörper oder Antigene kovalent mit magnetischen Nanopartikeln verbunden. Diese modifizierten Testsysteme sind meist schneller, besser reproduzierbar und genauer als die ursprünglichen (Šafařík et Šafaříková, 1999).

Ebenso werden die magnetischen Nanopartikel selbst als Therapiemittel genutzt, z. B. aufgrund ihres Verhaltens in hochfrequenten elektromagnetischen Feldern, welches zu einer Erwärmung der Partikel führt. Diese Eigenschaft der magnetischen Nanopartikel ermöglicht Verfahren wie die Hyperthermie bzw. Thermoablation – Behandlung. Bei der Hyperthermie wird eine lokal begrenzte Erwärmung des Tumorgewebes auf 40 bis 45° C während eines Zeitrahmens von 30 bis 60 Minuten angestrebt (Schulz et al., 1998). Allerdings variieren die in der Fachliteratur angegebenen Zieltemperaturen, je nach Abwandlung des Verfahrens. So wird beispielsweise die Zieltemperatur und Anwendungsdauer bei der Ganzkörperhyperthermiebehandlung mit 40 bis 42°C und 60 bis 90 Minuten angegeben, um eine schädliche Wirkung auf die Patienten zu minimieren. Wird eine Hyperthermiebehandlung auf ein örtlich begrenztes Areal angewendet, sind sogar Zieltemperaturen bis 47°C beschrieben worden. So werden von Ardenne (1997) Zieltemperaturen von 41°C bis 42°C, von Seegenschmiedt et al. (1996) Zieltemperaturen von 40,5°C bis 44°C und Madersbacher et al. (1996) Zieltemperaturen von 45°C bis 47°C im Zuge der Hyperthermiebehandlung beschrieben (Kießling, 2003).

Der kurative Effekt von magnetischen Nanopartikeln bei der Hyperthermiebehandlung besteht aus einer Schädigung der Tumorzellen, welche vermutlich auf physiologische Einflüsse zurückzuführen ist, und diese stärker als gesunde Körperzellen betrifft (Schulz et al., 1998). So werden durch die Wärmebehandlung eine Beeinträchtigung der Chromatinstruktur, Konformationsänderungen von Makromolekülen, die Behinderung zellulärer Reparaturmechanismen, Auflösung des Zytoskeletts und eine Hemmung der späten DNA-Synthesephase herbeigeführt (Weischedel et al., 1987). Um diese Wirkungen gezielt auf das Tumorgewebe anzuwenden, ist man bestrebt die verwendeten magnetischen Nanopartikel mit Antikörpern zu koppeln, welche an die selektiven

---

Antigene im Tumorort binden. So sollen sich die magnetischen Nanopartikel möglichst nur im Tumorgewebe anreichern, damit die nachfolgende Wärmeapplikation nur dort ihre tumorschädigende Wirkung entfalten kann (Shinkai et al., 1994). Leider kann die Hyperthermie mit den von ihr verwendeten Temperaturen (bis 43°C) keine irreversible Beeinträchtigung der Tumorzellen verursachen. Deshalb ist es nicht möglich, mit dieser Methode eine endgültige Heilung der Tumorerkrankung herbeizuführen. Daher wird heute die Hyperthermie meist als Kombinationstherapie mit den etablierten Behandlungsformen, wie chirurgische Tumorentfernung, Chemo-und Strahlentherapie, angewendet (Madersbacher et al., 1996).

Es ist möglich, mit magnetischen Nanopartikeln auch höhere Temperaturen zu erreichen. So werden, um maligne Zellen nachhaltig zu schädigen, bei dem Verfahren der Thermoablation Temperaturen verwendet, die weit über den Temperaturen liegen, welche im Rahmen der Hyperthermie angewandt werden. Die bei der Thermoablation verwendeten Temperaturen liegen in Bereichen von über 50°C (Medicine-Worldwide, 2002). Diesen hohen Temperaturen können Patienten nur ausgesetzt werden, wenn die Erwärmung lokal begrenzt wird. Allerdings ist diese Methode noch nicht etabliert. Hierzu sollen entweder die magnetischen Nanopartikel direkt in das Tumorgewebe injiziert, oder mit Hilfe von an die magnetischen Nanopartikel gekoppelten Antikörpern im Tumor angereichert werden. Neben der erreichten Temperatur ist auch die Dauer der Thermoablation ausschlaggebend für die irreversible Schädigung von malignen Zellen. So wird ein Zeitraum von 4 Minuten bei einer Temperatur von 58 - 65°C beschrieben, um eine humane Tumorzelle *in vitro* nachhaltig zu schädigen (Hilger et al., 2000).

Im Rahmen der Diagnostik werden magnetische Nanopartikel bereits eingesetzt. In der Magnetresonanztomographie (MRT) ergibt sich der Bildkontrast durch unterschiedliche Signalintensitäten, welche die verschiedenen Gewebearten in Abhängigkeit der speziellen Folge der angelegten Radiofrequenzimpulse hervorrufen. Diese Signale entstehen wie folgt: Die Kerne der in den Geweben enthaltenen Wasserstoffatome werden entlang eines starken Magnetfeldes ausgerichtet. Dies geschieht in Abhängigkeit der Protonendichte und der magnetischen Relaxationszeiten in den zu untersuchenden Geweben. Sendet man nun eine Radiowelle mit genau differenzierter Frequenz in das zu untersuchende

---

Gewebe, kann man die Atomkerne (Protonen) gezielt auslenken. Wird die Radiowelle abgeschaltet, kehren die Atomkerne in ihre Ausgangslage zurück und senden dabei ihrerseits eine Radiowelle aus. Diese Radiowellen werden aufgefangen und mit Hilfe von Computern in ein Bild umgerechnet. Die Geschwindigkeit, mit der die Atomkerne in ihre Ausgangslage zurückkehren, hängt von dem entsprechenden Gewebe ab. In Folge davon ist der Kontrast der MRT abhängig von der chemischen Zusammensetzung und molekularen Struktur des abgebildeten Gewebes (Gesundheitsinformationsnetz, 2005, Bulte et al., 1997).

In den frühen 80ern wurde erkannt, dass durch den Einsatz von zielspezifischen superparamagnetischen Nanopartikeln der Kontrast stark verbessert werden konnte. Superparamagnetische Nanopartikel führen dazu, dass Gebiete, welche Nanopartikel enthalten, im MRT – Bild als dunklere Bereiche erscheinen als Areale ohne Nanopartikel. Dieser Vorgang entsteht dadurch, dass superparamagnetische Nanopartikel die Geschwindigkeit ändern, indem Protonen von einem ausgelenkten Zustand auf ihren Ausgangszustand zurückfallen. Dadurch stellen sich Regionen die superparamagnetische Nanopartikel enthalten, als dunklere Bereiche im MRT-Bild dar, im Vergleich zu Regionen ohne. Wenn beispielsweise superparamagnetische Nanopartikel in die Leber appliziert werden, können gesunde Leberzellen die Partikel aufnehmen und erscheinen so im MRT dunkler als kranke Leberzellen (Martin et Mitchell, 1998). Die so als Kontrastmittel eingesetzten Nanopartikel können durch die bereits oben beschriebenen Modifikationen, wie die eine Dotierung mit Antikörpern, gezielt an den darzustellenden Bereich gebracht werden (Šafařík et Šafaříková, 2002).

## **2.2 Zielsetzungen**

Die vorliegende Arbeit legt ihren Schwerpunkt auf labortechnische Anforderungen an magnetische Nanopartikel. Ausgehend von den Ansprüchen, welche die Arbeitsgruppe für experimentelle Radiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena an magnetische Nanopartikel stellt, soll geklärt werden, wie magnetische Nanopartikel unter verschiedenen Bedingungen ihre Eigenschaften ändern. Dabei liegt das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf einer etwaigen Änderung der Teilchengröße, sowie in der Überprüfung und Verbesserung der Funktionalisierung von magnetischen Nanopartikeln mit Bioliganden.



---

Aus oben genannten Gründen (wie z. B. die Gefahr von Embolien) dürfen die magnetischen Nanopartikel keine Aggregate bilden. In der Fachliteratur wird, soweit bekannt, meist nicht auf Teilchengrößenänderungen der magnetischen Nanopartikel während der entsprechenden Versuche eingegangen. Hier soll nun diese Lücke geschlossen werden und gezeigt werden, wie sich verschiedene labortechnische Parameter auf die Teilchengrößenverteilung der magnetischen Nanopartikel auswirken. Mit verschiedenen Erklärungsansätzen sollen die Gründe aufgeklärt werden, warum magnetische Nanopartikel unter verschiedenen Bedingungen Agglomerate bilden bzw. dies nicht tun. Diese Arbeit soll ein Ansatz dazu sein, das Verhalten von magnetischen Nanopartikeln besser zu verstehen und vorherzusagen. Mit dem gewonnenen Wissen soll es möglich sein, magnetische Nanopartikel effektiver zu Verarbeiten und einzusetzen.

Magnetische Nanopartikel werden bei Verfahren wie Thermoablation oder Hyperthermie Temperaturen von 40°C und mehr ausgesetzt. All diese Anwendungen sind Gegenstand von viel versprechenden Forschungsansätzen (Medicine-Worldwide, 2002, Hilger et al., 2000, Shinkai et al., 1994, Madersbacher et al., 1996, Schulz et al., 1998). Es besteht die Möglichkeit, dass während der Wärmeapplikation durch Agglomerationen große Teilchen entstehen. Ist dies der Fall, muss die Gefahr von Embolien bedacht werden. Auch im Zuge von Funktionalisierungsreaktionen ist es vorstellbar, dass Partikelsuspensionen Wärme zugeführt wird, um die Anbindung von Liganden zu unterstützen. Es muss also festgestellt werden, ob eine solche Wärmeapplikation zu einer Vergrößerung der Teilchendurchmesser führt. Im Verlauf dieser Arbeit soll nun ermittelt werden, ob und wie magnetische Nanopartikel *in vitro* ihre Teilchendurchmesser ändern, nachdem sie Temperaturen bis 60°C ausgesetzt wurden.

Die Haltbarkeit und Lagerfähigkeit von magnetischen Nanopartikeln, sei es in nativer Form oder mit einem Liganden gekoppelt, stellt einen interessanten Aspekt dar. Da nur durch genaue Kenntnisse über diese Eigenschaften es vermieden werden kann, Versuche, mit durch zu lange Lagerung unbrauchbar gewordenen Nanopartikeln, zu gefährden. In einer Studie von Sommerfeld wurden poly(butyl cyanoacrylat) (PBCA) Nanopartikel verwendet und mit verschiedenen Hüllschichten, wie z.B. Dextran, Poloxamer oder Polysorbat versehen und in verschiedenen Lösungen (HCL, H<sub>2</sub>O

---

und PBS) aufbewahrt. Bei Messungen nach einem Jahr zeigte sich, dass die Partikel, welche in unbehandelten sauren Suspensionen aufbewahrt wurden, die konstantesten Teilchendurchmesser aufwiesen. In den anderen Fällen kam es zu Agglomerationen, wobei das Ausmaß der Agglomerationen von den individuellen Versuchsbedingungen abhing (Sommerfeld P et. al., 1997; 2000). Die Arbeiten von Sommerfeld et al. lassen die Hoffnung zu, dass auch die von uns verwendeten magnetischen Nanopartikel gelagert werden können und keine Agglomerate bilden, da auch hier eine Hüllschicht aus Dextran verwendet wird und die Nanopartikel in einer leicht sauren Lösung (pH 4,95) aufbewahrt werden. Die Feststellung der Teilchendurchmesser von frisch hergestellten magnetischen Nanopartikeln in nativem und funktionalisiertem Zustand und die Messung derselben Versuchsansätze nach einer Lagerung für 5 Monate sollen ermitteln, ob die Teilchengröße der verwendeten magnetischen Nanopartikel stabil geblieben ist.

Das in der Pharmazie häufig eingesetzte Verfahren der Lyophilisierung (Gefriertrocknung), dient dort der Einengung und Haltbarmachung verschiedener Substanzen wie z. B. Proteinen. Hierbei werden Suspensionen eingefroren und mittels Druckänderung der Atmosphäre über der Suspension die enthaltene Flüssigkeit dazu gebracht zu sublimieren (Essig/Oschmann, Lyophilisation, 1993). Dieses Verfahren wird ebenfalls bei magnetischen Nanopartikeln angewandt. So hat Shen die von ihm verwendeten Partikel (Monocrystalline Iron Oxide Nanocompounds (MION)) zur besseren Lagerung lyophilisiert (Shen et al., 1993). Auch die Arbeit von Heiati und Mitarbeitern stellt hierbei ein Beispiel dar. In dieser Arbeit wurden so genannte „solid lipid nanoparticles“ (SLNs) gefriergetrocknet (Heiati H et al., 1998). Allerdings sprechen Heiati und auch Sommerfeld von der Gefahr, dass magnetische Nanopartikel nach, bzw. bei der Lyophilisation agglomerieren. Diese Agglomerationen können allerdings durch cryoprotektive Zucker vermieden werden (Heiati H et al., 1998, Sommerfeld et al., 1997 et 2000). Da die in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel einen anderen Kern enthalten als die oben genannten, können die von Heiati und Sommerfeld ermittelten Daten nicht auf die hier gebrauchten magnetischen Nanopartikel übertragen werden.

Im Hinblick auf eine erleichterte Lagerung und die Möglichkeit, hergestellte Suspensionen aus magnetischen Nanopartikeln aufzukonzentrieren, stellt sich die Frage, ob es möglich ist, die in dieser Arbeit verwendeten magnetischen

---

Nanopartikel zu lyophilisieren. Da hierzu noch keine Untersuchungen stattgefunden haben, soll jetzt ermittelt werden wie sich die Teilchengröße der verwendeten magnetischen Nanopartikel verändert, wenn sie lyophilisiert werden. Zur Überprüfung werden native, d.h. unbehandelte und nicht funktionalisierte, magnetische Nanopartikel verdünnt und dann lyophilisiert. Sollten die Partikel stabil bleiben und es sich keine Agglomerate bilden, stellt das Verfahren der Lyophilisation eine gute Möglichkeit dar, die verwendeten magnetischen Nanopartikeln aufzukonzentrieren und besser zu lagern.

Die reproduzierbare Herstellung funktionalisierter magnetischer Nanopartikel macht es notwendig, ungebundene Liganden von den funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln abzutrennen. Bleiben in der Suspension Liganden zurück, wie z.B. Antikörper, so können sie Bindungsstellen an den Zielzellen blockieren und so eine Anlagerung der magnetischen Nanopartikel behindern. Ebenfalls können weitere Reaktionen zwischen den Liganden und ihren Reaktionspartnern zu Agglomerationen führen, deshalb gilt es diese aus dem Kopplungsansatz zu entfernen.

Andere Arbeiten, die sich mit der Funktionalisierung und dem Einsatz von magnetischen Nanopartikeln beschäftigen, beschreiben die Reinigung durch das Verfahren der Gelfiltration. Von Zhao et al. (2002) wird die Gelfiltration bei CLIO (cross-linked superparamagnetic iron oxid) Nanopartikeln eingesetzt, um HIV-1 tat Peptide abzutrennen. Auch Högemann et al. (2002) benutzt die Gelfiltration zur Entfernung unerwünschter Bestandteile bei der Arbeit mit CLIOs. Um  $\text{NaIO}_4$  aus einer Suspension aus MION (Monocrystalline iron oxid nanoparticles) zu entfernen, verwendet Remsen et al. (1996) ebenfalls die Gelfiltration. Bei Kresse et al. (1998) werden ebenfalls  $\text{NaIO}_4$  Moleküle und andere unerwünschte Reaktionsprodukte aus einer Suspension aus USPIOs (ultrasmall superparamagnetic iron oxid) mittels Gelfiltration entfernt. Eine Suspension aus LCDIO (lon-circulating dextran-coated iron oxid nanoparticles), die mit Jod 125 funktionalisiert und durch Gelfiltration gereinigt wurde, wird von Moore et al. (2000) beschrieben. Bei allen diesen Autoren wird das Verfahren der Gelfiltration als geeignetes Mittel angegeben um unerwünschte Bestandteile auf Nanopartikelsuspensionen zu entfernen, allerdings ist dies nur möglich, wenn sich die zu trennenden Substanzen in ihrer Größe maßgeblich

---

unterscheiden. In allen Arbeiten sind die Nanopartikel von einer Hüllschicht aus Dextran umgeben. Um welches Dextran es sich im genauen handelt wird nicht erwähnt. Die Reinigung der Suspensionen erfolgt im Basischen (Zhao et al., (2002), Högemann et al., (2002), Remsen et al., (1996), Kresse et al., (1998), Moore et al., (2000)). Da die von uns verwendeten magnetischen Nanopartikel ebenfalls mit einer Dextranhülle umgeben sind, erscheint es sinnvoll, in anbetracht dieser Arbeiten, zu überprüfen, ob dieses Reinigungsverfahren auch auf in dieser Arbeit verwendete Nanopartikelsuspensionen übertragbar ist. Jedoch wird, im Gegensatz zu in den oben genannten Studien, die die Trennung im Basischen durchführen, in der vorliegenden Arbeit, aufgrund der Anweisung des Herstellers, der ein Ausfallen der Nanopartikel im Basischen erwartet (Kautz, persönliche Mitteilung), ein pH-Wert von 4,95 verwendet.

Ein weiterer Weg der Reinigung von Nanopartikelsuspensionen stellt die Teilchengrößenseparation dar. Hier wird unter Anwendung des magnetischen Momentes der Teilchen eine Trennung der in der Suspension enthaltenen Stoffe durchgeführt. Zur Auftrennung von nativen magnetischen Nanopartikeln der Größe nach, wird die Teilchengrößenseparation bereits erfolgreich angewendet (Kießling, 2003). Auch Groß et al. (2002) verwendet die Teilchengrößenseparation um native magnetische Nanopartikel in verschiedenen Größen aufzuteilen. Högemann et al., (2002) gebraucht diese Methode, um nicht reagierte Peptide aus einer Suspension von CLIOs zu entfernen. Ungebundene Antikörper werden von Kang et al, (2002) aus einer Suspension von CLIOs mittels Teilchengrößenseparation abgetrennt. Bei den letztgenannten Arbeiten wird die Trennung im basischen durchgeführt, allerdings hat Kießling (2003) und Groß et al. (2002), ebenfalls wie in dieser Arbeit, einen sauren pH-Wert verwendet. Ob eine erfolgreiche Reinigung auch mit den von uns verwendeten funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln gelingt, soll diese Arbeit klären.

Die dritte Methode zur Reinigung nach der Funktionalisierungsreaktion ist die Waschung mittels eines Dauermagneten. Hierbei hält der Magnet die gekoppelten Teilchen fest, während der bewegliche Überstand der Suspension mehrmals ausgetauscht wird. Diese Methode wird auch von Gao et al. verwendet. Hier werden funktionalisierte siliziumumhüllte magnetische Nanopartikel gereinigt, ohne dass eine Vergrößerung der Teilchendurchmesser zu beobachten ist (Gao et al., 2003). In einer weiteren Arbeit wird eine funktionalisierte Nanopartikelsuspension von nicht-

---

gebundenen Proteinen mit diesem Verfahren gereinigt (Wang et al., 2003). Ebenfalls mit Hilfe eines Magneten und mehrerer Waschschrte reinigen Khalafalla und Reimers (1980) eine Suspension magnetischer Nanopartikel von unerwünschten Bestandteilen der Suspension. In der vorliegenden Studie soll geklärt werden, ob dieses Verfahren auch bei den von uns verwendeten dextranumhüllten magnetischen Nanopartikeln verwendbar ist.

Wie bereits erwähnt ist es, um magnetische Nanopartikel im Körper gezielt zu ihrem Wirkort zu bringen, möglich die magnetischen Nanopartikel mit spezifischen Antikörpern zu koppeln. Diese Antikörper sollen dann an die Antigene der gewünschten Gewebe (z. B. Tumoren) binden und so die Nanopartikel fixieren. Die Kopplungsreaktion läuft, vereinfacht dargestellt, wie folgt ab: durch Zugabe eines Kopplungsreagenzes werden die Carboxylgruppen der Hüllschicht aktiviert, um dann nach Hinzugeben der Liganden, mit diesen eine kovalente Verbindung einzugehen (Wang et al., 2003). Eine Optimierung der Kopplungsreaktion zwischen den verwendeten magnetischen Nanopartikeln und entsprechender Liganden ist deshalb von Bedeutung, da durch einen effizienten Funktionalisierungsvorgang zum einen eine höhere Menge des gewünschten Kopplungspartners an die Nanopartikel gebunden wird, und zum anderen ein optimiertes Verhältnis zwischen den eingesetzten Substanzen und den erhaltenen Nanopartikel/Liganden-Komplexen erreicht wird. Durch Variation der an der Funktionalisierungsreaktion beteiligten Parameter soll in dieser Arbeit ermittelt werden, wie eine solche Optimierung erreicht werden kann.

So soll die verwendete Menge des Liganden (z.B. ein Antikörper) variiert werden. Die Funktionalisierung der magnetischen Nanopartikel mit einem Antikörper ist, wie bereits erwähnt, für eine spätere Verwendung der Partikel von großem Nutzen. Dass mit Hilfe des verwendeten Kopplungsprotokolls eine Funktionalisierung der magnetischen Nanopartikel grundsätzlich möglich ist, ist bekannt.

Um diese Funktionalisierung durchzuführen verwendet auch Remsen et al. (1996) einen Antikörper (L6 bzw. P1.17), der an die Nanopartikel kovalent gebunden wird. Durch die Veränderung der Menge an zugegebenen Antikörpern soll ermittelt werden, ob sich die gebundene Menge an Antikörper maßgeblich erhöhen lässt, wenn eine höhere Menge an Antikörpern inkubiert wird. Das Verhältnis der

---

gebundenen Menge Antikörper, zu der Menge an zugegebenen Antikörpern soll, schon aus Gründen der Wirtschaftlichkeit so beschaffen sein, dass eine erhöhte Zugabe an Antikörpern auch zu einem deutlichen Anstieg an gekoppelten Antikörpern führt.

In dem hier verwendeten Kopplungsprotokoll wird EDC x HCL\* [\*N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid] als Kopplungsreagenz verwendet. Dasselbe Kopplungsreagenz wird auch von Wang et al. (2003) zur Anwendung gebracht, um Rinderserumalbumin an dextranumhüllte magnetische Nanopartikel zu binden. Es stellt sich nun die Frage, ob eine erhöhte Menge des Kopplungsreagenzes eine vermehrte Anbindung des entsprechenden Liganden zur Folge hat. Durch eine Variierung der Menge des verwendeten Kopplungsreagenzes soll überprüft werden, ob die gebundene Menge an Liganden erhöht werden kann, und ob dabei die Teilchengrößenverteilung der funktionalisierten magnetischen Nanopartikel unverändert bleibt.

Ferner soll überprüft werden, ob es möglich ist, die Bioliganden - Inkubationszeit (in diesem Fall die Antikörperinkubationszeit) zu verringern. Es ist einleuchtend, dass eine kürzere Inkubationszeit eine wirtschaftlichere Funktionalisierung der magnetischen Nanopartikel ermöglichen würde, da die Herstellung der funktionalisierten Nanopartikel schneller vonstatten ging und so etwaige Kosten (Arbeitszeit) verringert werden können. Es gilt zu klären, wo die ideale Antikörperinkubationszeit bezüglich der gebundenen Menge an Antikörpern liegt. Dafür sollen magnetische Nanopartikel jeweils mit dem gleichen Bioliganden (einem Antikörper) inkubiert werden, wobei die Inkubationszeit von 15 Minuten in mehreren Schritten auf 180 Minuten gesteigert wird. Eine nachfolgende Proteinbestimmung soll Aufschluss darüber geben, ob auch bei geringerer Inkubationszeit die gleiche Menge an Antikörpern an die magnetischen Nanopartikel gebunden ist.

---

### **3 Ziele der Arbeit**

Mit der vorliegenden Arbeit sollten folgende Aspekte untersucht werden:

1. Auswirkungen verschiedener Temperaturen auf die Teilchengrößenverteilung von magnetischen Nanopartikeln. Zum einen in nativem Zustand und zum anderen in funktionalisiertem Zustand.
2. Reaktion der Teilchengröße nativer magnetischer Nanopartikel auf die Lyophilisation der Partikel.
3. Haltbarkeit von nativen und funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln in Abhängigkeit von der Lagerdauer.
4. Untersuchungen zur Tauglichkeit verschiedener Methoden zur Reinigung von magnetischen Nanopartikelsuspensionen von ungebundenen Liganden.
5. Bei Funktionalisierung von magnetischen Nanopartikeln mit Bioliganden soll die Ausbeute an gebundenen Liganden durch eine Erhöhung der eingesetzten Menge an Bioliganden verbessert werden.
6. Bei Funktionalisierung von magnetischen Nanopartikeln mit Bioliganden soll die Ausbeute an gebundenen Liganden durch eine Erhöhung der eingesetzten Menge an Kopplungsreagenz verbessert werden.
7. Bei Funktionalisierung von magnetischen Nanopartikeln mit Bioliganden soll ermittelt werden, wie die ideale Antikörperinkubationszeit bezüglich der Ausbeute an gebundenen Liganden gewählt werden muss.

---

## 4 Arbeitsutensilien

### 4.1 Materialien und Chemikalien

Produkt	Hersteller
Antikörper HER/2-neu	Roche, 68305 Mannheim, BRD
BSA ( bovine serum albumin )	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Coomassie-Brillantblau G-250	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, BRD
EDC x HCL	Fluka SIGMA, 82024 Taufkirchen, BRD
Einmalküvetten	Plastibrand, Brand, BRD
Eppendorf Cups	Eppendorf, 50389 Wesseling-Berzdorf, BRD
Eppendorf Pipettenspitzen	Eppendorf, 50389 Wesseling-Berzdorf, BRD
Ethanol	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, BRD
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, 69126 Heidelberg, BRD
Falcontubs	Greiner, 72636 Frickenhausen, BRD
Glasmaterial	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, BRD
Sephadex G100	
LS-Säule	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch – Gladbach, BRD
Magnetische Nanopartikel	Innovent, 07743 Jena, BRD
PBS ( phosphat buffered saline )	GIBCO BRL Life Technologies Ltd., Paisley, Schottland
Pasteur-Pipetten	John Poulten Ltd. Barking, Essex, UK
Phosphorsäure	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, BRD



---

## 4.2 Geräte

Produkt	Hersteller
Auswertungsprogramm	Sigma plot 4.0
Auswertungsprogramm ( <i>Proteinbest.</i> ) Swift II, Wavescan	
Auswertungsprogramm Laserdiff.	Coulter
Digitalkamera	Verschiedene Hersteller, Medienzentrum FSU
Eppendorfpipetten ( 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 2500 µl )	Eppendorf, 50389 Wesseling-Berzdorf, BRD
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, BRD
Flammenatomabsorptionsspektrometer	Analytik Jena AG, Jena, BRD
Kühlschrank	
Gefrierschrank -20°C	
Gefrierschrank -80°C	
Magnetrührer	Ikamag RCT, IKA-Labortechnik, BRD
Rotierer ( beheizbar )	Promega, 68199 Mannheim, BRD
Dauermagnet	Promega, 68199 Mannheim, BRD
Uhr	Hanhart, BRD
Vortex ( Schüttler )	Scientific Industries, Inc. Bohemia, N.Y., USA

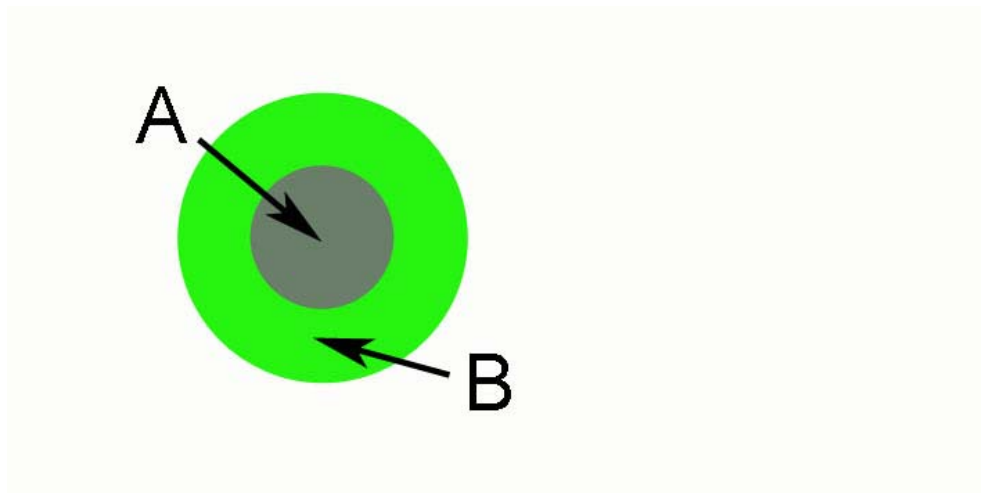
---

## 5 Methoden

### 5.1 Immobilisierung von Antikörpern an magnetischen Nanopartikeln

#### 5.1.1 Charakterisierung der magnetischen Nanopartikel

Magnetische Nanopartikel bestehen aus suspendierten Eisenoxidpartikeln, welche von einer biokompatiblen und chemisch reaktionsfähigen Hülle aus Polysacchariden umgeben sind (siehe Abb. 1). Diese sorgt dafür, dass Proteine gebunden werden können und dass die Partikel in Suspension bleiben.



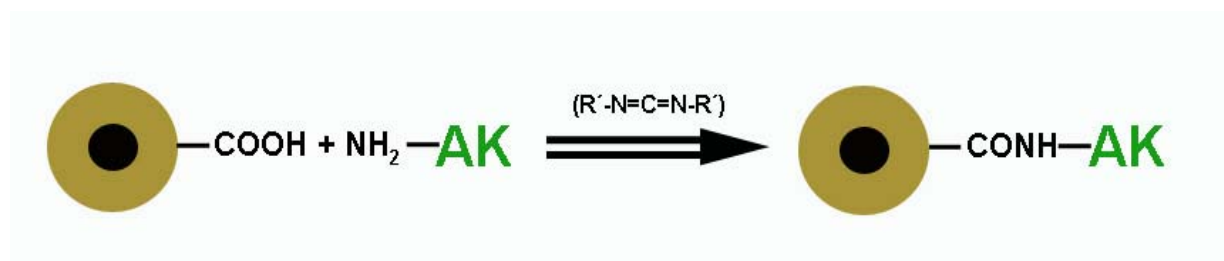
**Abb. 1: Schema für Magnetische Nanopartikel mit eisenoxidhaltigem Kern (A) und ihrer Hüllschicht aus Polysacchariden (B)**

Die in dieser Arbeit verwendeten magnetischen Nanopartikel verfügen über folgende Eigenschaften: Der Kern der magnetischen Nanopartikel kann als Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) und als Maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) vorkommen, wobei der Anteil des Magnetits 14,03 %, der Anteil des Maghemits 85,97 % beträgt. Als Hüllschicht fungiert Carboxymethyl-dextran, bzw. Carboxymethyldextrin. Der durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser der Partikel beträgt ca. 150 nm. Die Suspension verfügt über einen pH-Wert von 4,95 (H. Allner, persönliche Mitteilung).

---

### 5.1.2 Kopplung von Antikörpern an magnetische Nanopartikel

Um die magnetischen Nanopartikel auf die Kopplung mit einem Antikörper vorzubereiten, wird zuerst mit 1 molarem PBS (phosphate buffered saline) pH ~ 4,95 verdünnt, wobei 300 µl MNP-Suspension 500 µl PBS zugegeben werden. Nachdem die magnetischen Nanopartikel und das PBS mittels eines Vortexers gut durchgemengt wurden, wird als Kopplungsreagenz 8 mg EDC x HCL \* [N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid] (gelöst in 50 µl PBS 1 M, pH~4,95) hinzugegeben. Werden nun Antikörper der Suspension beigemischt, fungiert das Kopplungsreagenz als Katalysator und die Antikörper binden kovalent an die Hüllschicht der magnetischen Nanopartikel. Die Abb. 2 zeigt eine schematische Darstellung der Kopplungsreaktion zwischen magnetischem Nanopartikel und Antikörper. Im Verlauf der verschiedenen Versuchsansätze wurde die Konzentration des Kopplungsreagenzes (8 mg und 16 mg EDC x HCL) variiert. Wurden allerdings andere Versuchsparameter, wie z. B. Proteinmengen und Antikörperinkubationszeit betrachtet, wurden 8 mg EDC x HCL in 50 µl PBS gelöst und dem Gemisch beigemischt. Die nachfolgenden Konzentrationen der verwendeten Antikörper kamen je nach Versuchsanforderung zur Anwendung (0,5 mg/ml bis 10 mg/ml). Bei der Variation der Antikörperinkubationszeiten wurden Zeiten von 15 Min. bis 180 Min. verwendet.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Kopplungsreaktion zwischen magnetischem Nanopartikel und Antikörper. In Anwesenheit des Kopplungsreagenz, ein Carbo-di-amid ( $R'-N=C=N-R'$ ) kommt es zwischen den Carboxylgruppen der Hüllmoleküle, welche den magnetischen Kern des Nanopartikels umgeben, und den Aminogruppen der Antikörper zur Reaktion.

Nach abermaligem vortexen wird das Gemisch 30 Min. lang bei Raumtemperatur (20°C) inkubiert. Dabei wird die Suspension kontinuierlich durchmischt (300 U/Min.). Abschließend wird die Suspension mit verschiedenen Mengen, bzw. Konzentrationen von Antikörpern (s. o.), abermals bei Raumtemperatur (20°) und unter verschiedenen

---

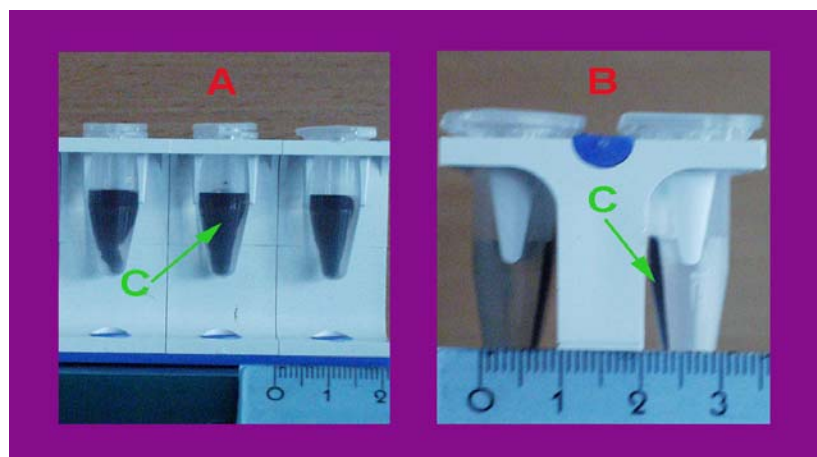
Inkubationszeiten (s. o.), kontinuierlich durchmengt (300 U/Min.). Die fertigen magnetischen Nanopartikel-Antikörper-Komplexe werden bei 2°C aufbewahrt.

## 5.2 Abtrennung nicht gebundener Antikörper

Um die magnetischen Nanopartikel-Antikörper-Komplexe später verwenden zu können, müssen die nicht gebundenen Antikörper aus der Suspension entfernt werden. Dies geschah mit Hilfe der folgenden Trennmethoden: Abtrennung mittels Dauermagnet, Reinigung mittels Gelfiltration und Abtrennung mittels Teilchengrößenseparation.

### 5.2.1 Abtrennung überschüssiger Antikörper mittels eines Dauermagneten

Die sich in Eppendorf-Cups befindende Suspension (magnetische Nanopartikel-Antikörper-Komplexe und ungebundene Antikörper) wird in einem Dauermagneten so positioniert, dass sich die in Suspension vorliegenden Nanopartikel / Antikörper – Komplexe aufgrund magnetischer Anziehungskräfte an der Wand des Cups anlagern, die dem Magneten am Nächsten ist (siehe Abb. 3). Nicht an Nanopartikel gebundene Antikörper verbleiben in der Suspension frei schwebend. Nach ca. zwei Tagen ist dieser Vorgang abgeschlossen und die Antikörpersuspension kann mit einer Pipette



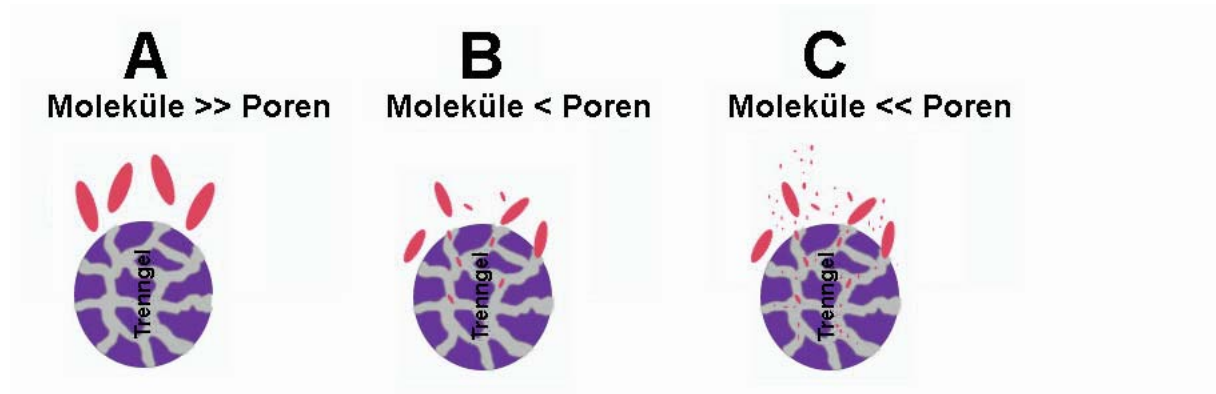
**Abb. 3: Reinigung mittels Dauermagneten. Die magnetischen Nanopartikel–Antikörper–Suspensionen in Eppendorf-Cups, die sich im Dauermagneten befinden, einmal in der Frontansicht (A) und einmal in der Seitenansicht (B). Die magnetischen Nanopartikel-Antikörper-Komplexe werden durch das Magnetfeld an die Wand des Eppendorff-Cups gezogen (C). Die ungebundenen Antikörper dagegen bleiben in Lösung.**

---

Nanopartikel / Antikörper – Komplexe werden nun mittels eines Vortexers wieder in Suspension gebracht. Der beschriebene Trennvorgang mit dem Dauermagneten wird dreimal wiederholt. Nach dem letzten Trennungsschritt werden die Nanopartikel / Antikörper – Komplexe mit 300 µl destilliertem Wasser (Volumen der magnetischen Nanopartikel-Suspension vor der Kopplungsreaktion) aufgefüllt.

## 5.2.2 Abtrennung überschüssiger Antikörper mittels Gelfiltration

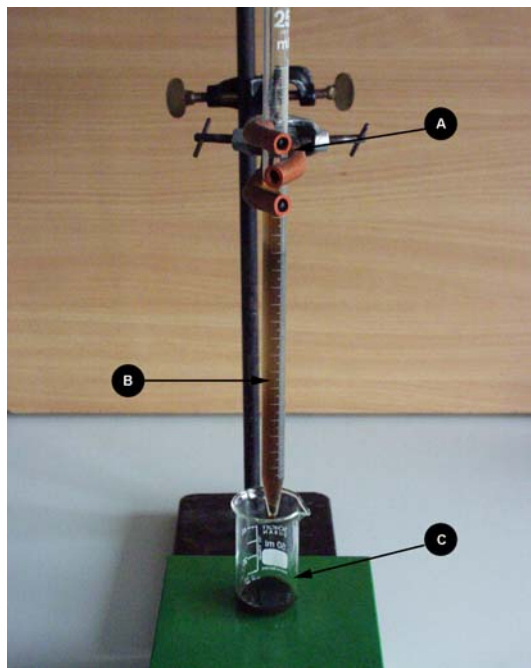
Eine andere Trennungsmethode, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, stellt die Gelfiltration dar. Sie trennt Moleküle mit unterschiedlichem Molekulargewicht, also nach der Größe der Moleküle. Die Elution erfolgt isokratisch, d. h. mit nur einem Puffer und ohne Gradienten, wobei die Zusammensetzung des Puffers keinen Einfluss auf die Trennung hat. Als Gelmatrix werden kugelförmige Polymere verwendet, welche aufgrund ihres Vernetzungsgrades porös sind.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Abtrennung von Molekülen der Größe nach mittels Gelfiltration. Gezeigt werden das Trenngel (violett) und die zu trennenden Moleküle (rot dargestellt) und deren Durchlauf durch das Gel. **A:** Die Moleküle sind weit größer als die Poren des Trenngeles. Sie gleiten ungehindert an den Gelpartikeln vorbei und werden so am schnellsten eluiert. **B:** Sind in dem zu trennenden Gemisch Moleküle vorhanden, die kleiner als die Poren der Gelpartikel sind, werden sie auf ihrem Weg durch den Gelpartikel so gebremst, dass sie später als die großen Moleküle eluiert werden. **C:** Sind Moleküle vorhanden, welche um ein Vielfaches kleiner als die Poren sind, werden sie als letztes eluiert. Sie benötigen die längste Zeit für ihren Weg durch die Gelpartikel (nach Lottspeich und Zorbas, 1998).

In diese Poren können kleinere Teilchen geeigneter Größe eindiffundieren. Hierdurch wird ihre Durchlaufgeschwindigkeit durch das Gel verlangsamt (siehe Abb. 4). Umgekehrt eluieren größere Teilchen an den Gelporen vorbei, sie gelangen somit

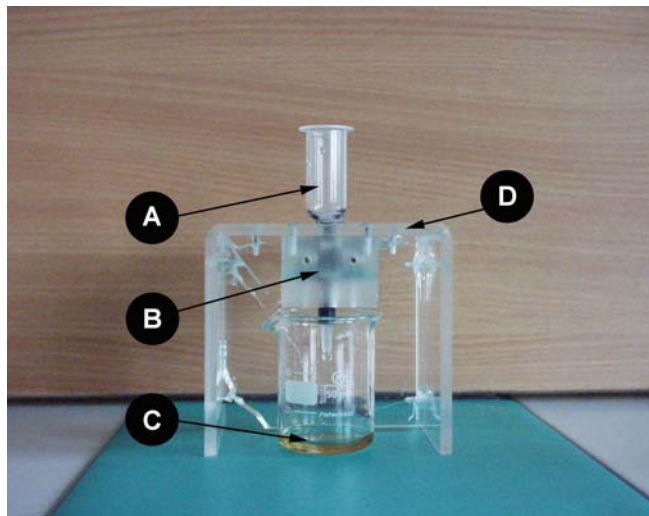
schneller durch das Gel. Als Folge davon eluieren hochmolekulare Teilchen vor niedermolekularen Teilchen. Nimmt man zu verschiedenen Zeiten, am unteren Säulenende Eluate ab, kann man eine Lösung in ihre Bestandteile, entsprechend ihrer Größe, auftrennen. Davon ausgehend, dass die Komplexe aus magnetischen Nanopartikeln und Antikörpern deutlich größer als die ungebundenen Antikörper sind, kann demnach das Ferrofluid in magnetische Nanopartikel und den in Lösung befindlichen Bestandteilen, über deren Größenunterschied aufgetrennt werden. Hierzu wird eine Glassäule mit einem Gel (Sephadex G 100) befüllt (siehe Abb. 5.).



Gibt man nun die Nanopartikel / Antikörper – Komplex-Suspension auf diese Säule und spült mehrmals, in zuvor festgelegten Zeitabständen von 5 Min., mit 2500  $\mu$ l PBS, so wandern die einzelnen Bestandteile nacheinander durch die Säule. Wobei die Größten Teilchen, sprich Nanopartikel / Antikörper – Komplexe zuerst eluiert werden. Aufgrund der starken Eigenfarbe der Nanopartikel ist es einfach, die Fraktion mit der größten Konzentration an magnetischen Nanopartikeln abzutrennen.

**Abb. 5: Versuchsaufbau zur Trennung einer Suspension aus magnetischen Nanopartikeln und Antikörpern mittels Gelfiltration. Sie zeigt die mit dem Filtrationsgel (Sephadex G100) gefüllte Glassäule in ihrer Halterung (A), die zu trennende Suspension, wie es durch das Gel eluiert [braun] (B) und eines der aufgefangen Eluate (C).**

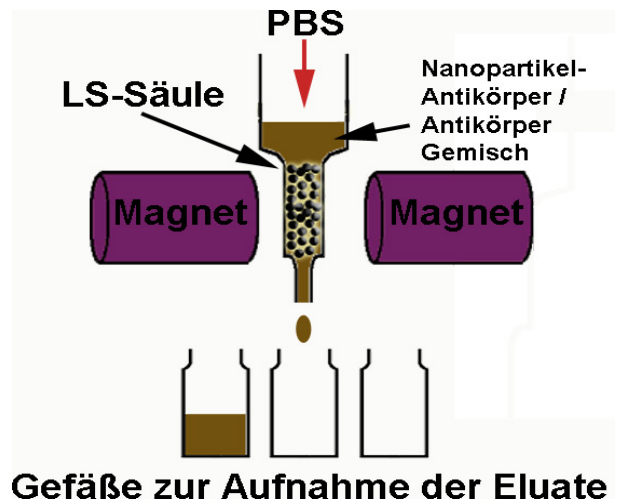
### 5.2.3 Abtrennung überschüssiger Antikörper mittels Teilchengrößenseparation



**Abb. 6: Experimenteller Aufbau zur Teilchengrößenseparation.** Eine magnetische Säule (A) wie sie sich in ihrer Halterung (D) befindet. Die Position der beiden Magneten ist mit (B) gegenzeichnet. Das bereits aufgefangene Eluat ist mit (C) markiert.

Aufgrund seiner schwarzbraunen Farbe kann man gut erkennen wie das Gemisch durch die Säule eluiert. Kurz bevor es am unteren Säulenende ankommt, wird, wie in Abb. 6 gezeigt, die LS-Säule zwischen zwei Magneten positioniert (das Magnetfeld zwischen den Magneten beträgt 50 mT [Stonane, persönliche Mitteilung]). Die in der LS-Säule enthaltenen Eisenkugeln verstärken den lokalen Feldgradient und die Nanopartikel –Antikörper - Komplexe bleiben an den Eisenkugeln haften. Nun wird die LS-Säule dreimal mit 3 ml PBS

Eine magnetische Säule (LS-Säule, Firma Miltenyi) ist eine mit Eisenkugeln gefüllte Säule, die zur Teilchengrößentrennung von magnetischen Nanopartikeln verwendet werden kann. Die Trennung erfolgt hierbei über das magnetische Moment der Teilchen. Da ungebundene Antikörper nicht magnetisch sind, werden sie eluiert, während an magnetische Nanopartikel gebundene Antikörper in der Säule verbleiben. Die LS-Säule wird mit PBS gefüllt und das Nanopartikel-Antikörper / Antikörper Gemisch auf die LS-Säule gegeben.



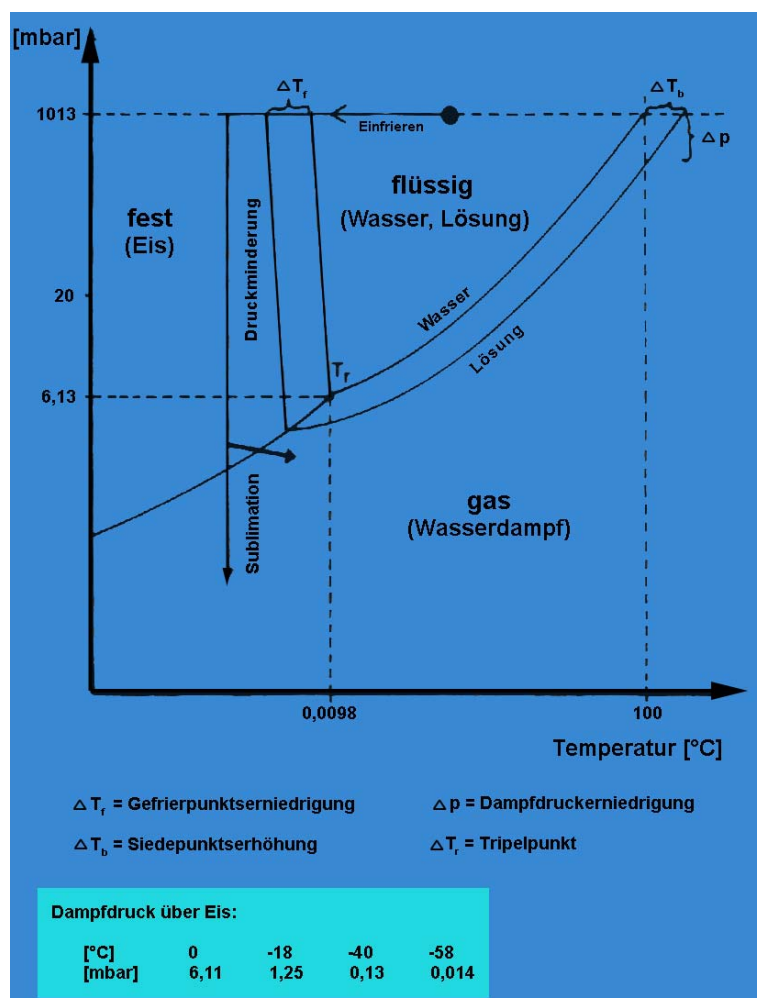
**Gefäße zur Aufnahme der Eluate**

**Abb. 7: Schematische Darstellung des Trennvorgangs einer Suspension aus magnetischen Nanopartikeln und Antikörpern durch die Teilchengrößenseparation, sowie die Position der LS-Säule zwischen den beiden Magneten.**



(nach Herstellerangabe) gespült, so dass die nicht gebundenen Antikörper ausgeschwemmt werden, während die magnetischen Nanopartikel – Antikörper - Komplexe an den magnetisierten Eisenkugeln haften bleiben. Die Eluate der verschiedenen Spülungen werden, zu weiteren Untersuchungen, einzeln aufgefangen. Um die zurück gebliebenen Nanopartikel – Antikörper -Komplexe aus der LS-Säule zu entfernen, entfernt man diese aus dem Magnetfeld. Ohne das fixierende Magnetfeld können die Komplexe nun mit 5 ml PBS ausgespült werden. Zur weiterführenden Erläuterung ist in Abb. 7 der schematische Versuchsaufbau dargestellt.

### 5.3 Lyophilisation magnetischer Nanopartikel



**Abb. 8:** Zustandsdiagramm des Wassers und einer wässrigen Lösung und Prozessschritte bei der Gefriertrocknung (nicht maßstäblich) zur Erläuterung des Vorganges der Lyophilisation (Essig/Oschmann, 1993)

Eine Methode um magnetische Nanopartikel einzuengen stellt die Lyophilisation oder Gefriertrocknung dar. Aufgrund der besonderen physikalischen Eigenschaften des Wassers, in Abb. 8 verdeutlicht, sublimiert dieses bei einem bestimmten Druck und einer bestimmten Temperatur direkt aus dem festen Zustand in den gasförmigen Zustand über. Die Suspensionen aus magnetischen Nanopartikeln werden also in den Gefriertrockner eingebracht und eingefroren. Danach wird über der Suspension ein Vakuum erzeugt und der Trocknungsvorgang, unterteilt



---

in Primär – und Sekundärtrocknung, beginnt. Die Primärtrocknung stellt den Vorgang der Sublimation von Eis dar, während die Sekundärtrocknung das Verdampfen von Wasser bezeichnet. Der Punkt an dem Eis, flüssiges Wasser und Wasserdampf koexistieren wird Tripelpunkt genannt  $T_f$  (siehe Abb. 8). Er liegt bei reinem Wasser bei 611 P (6,13 mbar) und 273,16 K. Sind Stoffe in dem Wasser gelöst, verschieben sich die Phasengrenzen, wobei sich der Gefrierpunkt  $\Delta T_f$  erniedrigt, der Siedepunkt um  $\Delta T_b$  erhöht und der Dampfdruck über der Lösung um  $\Delta p$  sinkt. Bei der Lyophilisation erfolgt das Einfrieren meist bei Atmosphärendruck. Die Endtemperatur muss so tief liegen, dass beim zweiten Schritt, dem Absenken des Druckes, die Phasengrenze zwischen fest und gasförmig überschritten wird. Dadurch geht während der Primärtrocknung Wasser unmittelbar aus dem Eis in den Damp fzustand durch Sublimation über (Essig/Oschmann, 1993).

## **5.4 Bestimmung der Menge an gebundenen Antikörpern**

### **5.4.1 Grundprinzip der Proteinbestimmung nach Bradford**

Bei der Methode nach Bradford erfolgt die Bindung von Coomassie-Brilliantblau G-250 an die zu messenden Proteine im sauren Milieu. In Anwesenheit von Proteinen wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes verändert, und zwar von 495 nm ohne Protein zu 595 nm mit Protein. Als Maß für die Proteinkonzentration der Lösung dient die Zunahme der Absorption bei 595 nm, welche photometrisch bestimmt wird. Als Eichkurve für die Proteinbestimmung diene Rinderserumalbumin (BSA) 0,5 mg / ml (Bradford, 1976).

### **5.4.2 Experimentelle Durchführung**

Beginnend wurde das Bradford-Reagenz hergestellt. Hierzu wurden 100 ml Coomassie-Brilliantblau G-250 in 50 ml 50 %igem Ethanol gelöst, mit 100 ml 85 %iger Phosphorsäure versetzt und mit demineralisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt. Abschließend wurde diese Lösung über einen Faltenfilter filtriert. Zur Aufstellung einer Referenzkurve wird die Rinderserumalbumin -Lösung (0,5 mg / ml) mit dem

Bradford-Reagenz zusammenpipettiert, wobei für jede Proteinkonzentration ein dreifacher Ansatz hergestellt wird. Das Schema ist in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1: Herstellung einer Referenzkurve bei der Ermittlung von Antikörperkonzentrationen mit der Proteinbestimmung nach Bradford. Die BSA-Lösung (Konzentration von 0,5 mg / ml) wird pro Zeile jeweils mit der entsprechenden Menge an Wasser und Bradford-Reagenz gemischt (s. Text). Dies ergibt einen Protein-Gehalt wie in der vierten Spalte angegeben. Die entstandenen Lösungen werden als Referenzproben genutzt.**

BSA-Lösung (µl)	H <sub>2</sub> O (µl)	Bradford-Reagenz (µl)	BSA-Gehalt (µg / ml)
0	100	1000	0
2	98	1000	1
5	95	1000	2,5
10	90	1000	5
15	85	1000	7,5
20	80	1000	10

Der Versuchsansatz wird durchmischt und nach einer Inkubationszeit von 10 bis 30 Min. mit 1000 µl Bradford-Reagenz bei 595 nm photometrisch gemessen. Die zu bestimmenden Suspensionen aus magnetischen Nanopartikeln und Antikörpern werden auf die gleiche Weise angesetzt und mit Hilfe eines Spektralphotometers, sowie mittels einer geeigneten Computersoftware, gemessen und aufgezeichnet. Entsprechende Proteinkonzentrationen wurden dann aus der Eichkurve abgeleitet.

## **5.5 Teilchengrößenmessung magnetischer Nanopartikel mittels Laserdiffraktometrie**

### **5.5.1 Grundlagen der angewandten Messmethode**

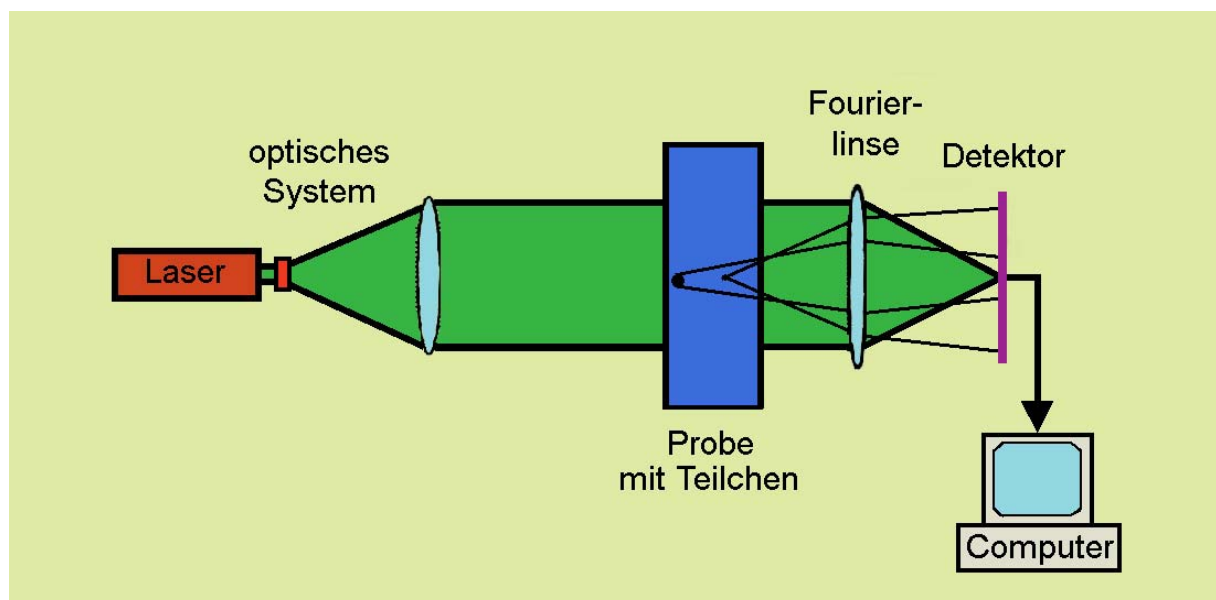
Die Laserdiffraktometrie beruht auf der Beugung des Lichtes. Wenn Licht auf Teilchen trifft, entstehen unterschiedliche Beugungsbilder, abhängig von der Größe und Gestalt der Teilchen. Radialsymmetrische Bilder entstehen bei Anwesenheit von kugelförmigen Teilchen. Die Stärke des gebeugten Lichtes wird von dem Detektor erfasst und von einem Computer ausgewertet (siehe Abb. 9). Bei der Messung von

---

magnetischen Nanopartikeln werden deren hydrodynamische Durchmesser bestimmt.

### 5.5.2 Messprinzip und Messanordnung

Die Lichtquelle zur Erzeugung der Beugungsbilder ist Laserlicht, welches mit einem optischen System aufgeweitet wird. An den sich im Messvolumen befindenden Teilchen kommt es dann zur Beugung des Laserlichtes, wobei das erzeugte Beugungsbild charakteristisch für die Form und Größe eines jeden Teilchens ist. Eine nachgeschaltete Fourierlinse dient dazu, die Beugungsbilder, unabhängig von der Position des Teilchens im Messvolumen, immer auf dieselbe Position auf dem Detektor zu projizieren.



**Abb. 9:** Schematischer Aufbau eines Laserdiffraktometers zur Teilchengrößenmessung und Darstellung der Unterschiedlichen Beugungswinkel großer und kleiner Teilchen und wie diese auf dem Detektor abgebildet werden (Müller & Schuhmann, 1997).

Die Detektoren setzen sich aus kreisförmig angeordneten Detektorelementen zusammen, wobei es sich bei den Elementen meist nur um Ringsegmente handelt. Der Außen - und Innenkreisradius der einzelnen Ringsegmente nimmt von innen nach außen zu. Diese Anordnung wird durch die physikalische Auflösung des Messgerätes begründet, wobei beugungswinkel- bzw. teilchengrößenabhängige

---

Veränderungen der Intensitätsverteilung hier als Ursache genannt werden. Die Intensität des Lichtes wird auf jedem Detektorelement erfasst. Dies hat zur Folge, dass der Intensitätsverteilung auf Grund der Anordnung der Detektorelemente eine Radialsymmetrie „aufgezwungen“ wird. Deshalb können nur kugelförmige Teilchen genau gemessen werden, da nur sie ein radialsymmetrisches Beugungsbild erzeugen, wobei davon ausgegangen wird, dass die in dieser Arbeit verwendeten magnetischen Nanopartikel nahezu kugelförmig sind. Durch einen, in das Messgerät eingebauten Rührmechanismus werden die zu messenden Suspensionen umgewälzt und so die enthaltenen Teilchen in Schwebelage gehalten. Die gemessenen Daten werden an einen Computer übermittelt und von ihm, mit Hilfe geeigneter Software, ausgewertet. Eine ausführliche Charakterisierung der Laserdiffraktometrie wie auch eine gründliche Darstellung der Teilchengrößenberechnung, ist im Kurzlehrbuch „Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis“ zu finden (Müller & Schuhmann, 1997). Das gewonnene Datenmaterial wurde mit den PC-Programmen Coulter LS und SigmPlot ausgewertet. Die Darstellung erfolgt zum einen als Volumenanteil pro Teilchendurchmesser und zum anderen als Teilchenanteil pro Teilchendurchmesser. Die angegebenen Volumenprozent-Angaben beziehen sich anteilig auf das gesamte Volumen der gemessenen Messproben. Der beschriebene Teilchenanteil bezieht sich auf die Gesamtheit aller gemessenen Teilchen einer Messprobe.

---

## **6 Ergebnisse**

### **6.1. Einfluss der Temperatur auf das Aggregationsverhalten von magnetischen Nanopartikeln**

#### **6.1.1 Native magnetische Nanopartikel**

Nach Exposition der nativen magnetischen Nanopartikel, d.h. magnetische Nanopartikel, die nicht mit einem Liganden funktionalisiert wurden, für fünf Stunden bei 40°C und 60°C zeigten sich in der nachfolgenden Messung mittels Laserdiffraktometrie folgende Teilchendurchmesser, wobei die genannten Durchmesser den Partikeln einschließlich deren Hydrathülle entsprechen. Die Kurvenverläufe der Teilchengröße in Abhängigkeit der Volumenverteilung (Abb.: 10/A), weisen zwei Gipfel auf. Den Ersten bei einer Teilchengröße von ca. 80 nm und den Zweiten bei ca. 280 nm, wobei keine Verschiebung aufgrund der eingewirkten Temperatur besteht.

Die Teilchendurchmesser der nativen unbehandelten (Raumtemperatur) magnetischen Nanopartikel bilden bei einem Teilchendurchmesser von 77,0 nm mit einem Volumenanteil von  $7,5 \pm 0,06$  % am Gesamtvolumen den höchsten Punkt des ersten Kurvengipfels. Der zweite Kurvengipfel liegt bei einem Teilchendurchmesser 311,0 nm mit einem Volumenanteil von  $2,5 \pm 0,02$  %. Die größten Teilchendurchmesser betragen 496,0 nm bei einem Volumenanteil von unter 0,01 %. Die Teilchendurchmesser der nativen magnetischen Nanopartikel, die einer Temperatur von 40°C ausgesetzt waren, ergaben einen ersten Kurvengipfel bei einem Teilchendurchmesser von 77,0 nm mit einem Volumenanteil von  $7,7 \pm 0,12$  %. Das zweite Kurvenmaximum liegt bei 258,0 nm mit einem Volumenanteil von  $2,5 \pm 0,03$  % am gemessenen Gesamtvolumen. Die größten Teilchendurchmesser betragen 496,0 nm bei einem Volumenanteil von unter 0,01 %.

Der bei einer Temperatur von 60°C behandelte Versuchsansatz zeigt seinen ersten Kurvengipfel bei 77,0 nm mit einem Anteil von  $8,0 \pm 0,22$  % am Gesamtvolumen und einen zweiten bei 258,0 nm bei einem Volumenanteil von  $2,4 \pm 0,13$  %. Die größten Teilchendurchmesser betragen 545,0 nm bei einem Volumenanteil von unter 0,01 %.

Eine zusammenfassende Volumengrößenverteilung der durchgeführten Versuche und der unbehandelten nativen magnetischen Nanopartikel ist in der nachfolgenden Tabelle (Tab.: 2) dargestellt.

**Tab.: 2**      **Volumenverteilung der nativen magnetischen Nanopartikel unbehandelt (RT) und nach fünfstündiger Exposition bei Temperaturen von 40 und 60°C. Die gemessenen Teilchendurchmesser beziehen sich auf den Durchmesser der Partikel einschließlich deren Hydrathülle und wurden mit einem Laserdiffraktometer bestimmt. Alle Versuchsansätze wurden mindestens dreimal gemessen und die Experimente durch einen Wiederholungsversuch bestätigt. (MNP: Magnetische NanoPartikel)**

Volumen- verteilung %<	Native MNP		
	Teilchendurchmesser (nm)		
	RT (unbehandelt)	40°C	60°C
<b>10</b>	54,3 $\pm < 0,001$	54,0 $\pm < 0,001$	53,4 $\pm < 0,001$
<b>25</b>	68,7 $\pm < 0,001$	68,0 $\pm < 0,001$	66,7 $\pm < 0,001$
<b>50</b>	94,3 $\pm < 0,001$	92,0 $\pm < 0,001$	89,8 $\pm < 0,001$
<b>75</b>	146,3 $\pm < 0,001$	141,0 $\pm < 0,001$	133,0 $\pm < 0,001$
<b>90</b>	255,7 $\pm < 0,001$	254,0 $\pm < 0,001$	245,0 $\pm < 0,001$

In einer weiteren Auswertung des Datenmaterials ist der Teilchendurchmesser in Abhängigkeit des Teilchenanteiles abgebildet (Abb.: 11/B).

Der größte Anteil der nativen unbehandelten magnetischen Nanopartikel liegt mit  $13,14 \pm 0,05$  % bei einem Teilchendurchmesser von 48,0 nm. Sehr wenige Teilchen (unter 0,01 %) sind bis zu 545,0 nm groß.

Die nativen magnetischen Nanopartikel, die einer Temperatur von 40°C ausgesetzt waren, zeigen den höchsten Anteil an Teilchen ( $13,6 \pm 0,05$  %) der insgesamt gemessenen Teilchen bei einem Durchmesser von 40,0 nm und zeigen einen geringen Teilchenanteil von unter 0,01 % bei einer Größe von 412,0 nm.

Der bei einer Temperatur von 60°C behandelte Versuchansatz zeigt sein Maximum an Teilchen bei einem Teilchendurchmesser von 48,0 nm mit einem Prozentsatz von  $13,4 \pm 0,05$  %. Die größten Teilchen sind, mit einem kleinen Anteil von unter 0,01 % der Menge aller gezählten Teilchen, 412,0 nm groß.

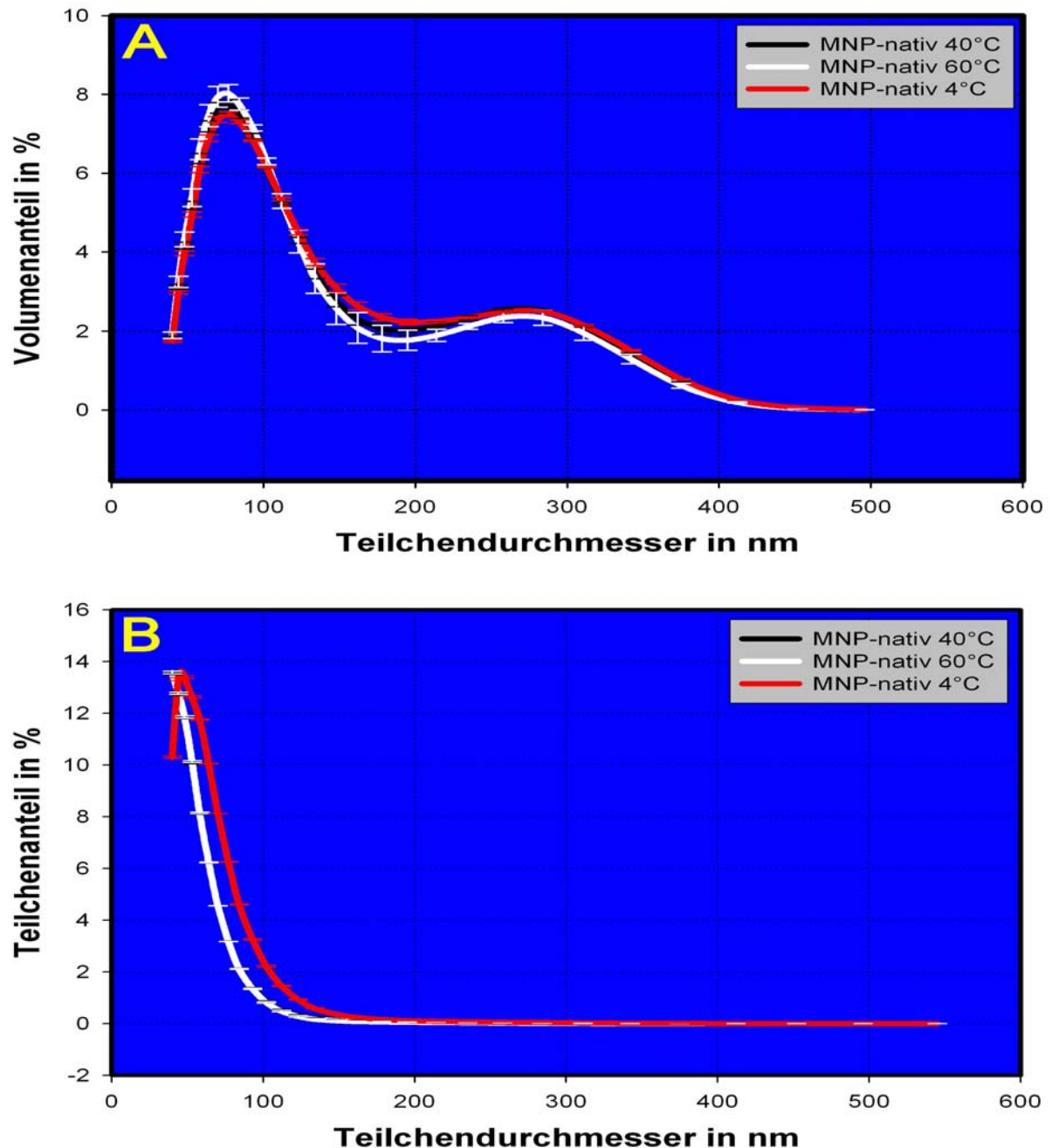


Abb.: 11 Teilchengrößenverteilung nativer magnetischer Nanopartikel nach fünfmonatiger Exposition von verschiedenen Temperaturen: Schaubild **A** zeigt den Volumenanteil in Abhängigkeit der Teilchendurchmesser. Schaubild **B** zeigt den Teilchenanteil in Abhängigkeit der Teilchendurchmesser. Die gemessenen Teilchendurchmesser beziehen sich auf den Durchmesser der Partikel einschließlich deren Hydrathülle und wurden mit einem Laserdiffraktometer bestimmt. Alle Messungen wurden sechsmal wiederholt und die Experimente durch einen Wiederholungsversuch bestätigt. (MNP: Magnetische Nanopartikel)

### 6.1.2 Funktionalisierte magnetische Nanopartikel

---

Im Gegensatz zu nativen magnetischen Nanopartikeln zeigten funktionalisierte magnetische Nanopartikel nach einer fünfstündigen Exposition bei 40° und 60°C eine Vergrößerung der Teilchendurchmesser (Abb.: 12/A und B). Alle Ergebnisse wurden sechsmal im Laserdiffraktometer bestimmt. Die gemessenen Teilchendurchmesser entsprechen den Nanopartikeln einschließlich Hydrathülle.

Die Teilchendurchmesser der funktionalisierten unbehandelten magnetischen Nanopartikel bilden mit einer Teilchengröße von 77,0 nm und mit einem Volumenanteil von  $7,2 \pm 0,34\%$  des gemessenen Gesamtvolumens den ersten Kurvengipfel. Das zweite Kurvenmaximum liegt mit einer Teilchengröße von 258,0 nm bei einem Volumenanteil von  $3,1 \pm 0,07\%$ . Die größten Teilchendurchmesser betragen 496,0 nm und machen einen Volumenanteil von weniger als 0,01 % aus.

Die Teilchendurchmesser der funktionalisierten magnetischen Nanopartikel, die einer Temperatur von 40°C ausgesetzt waren, ergaben einen ersten Kurvengipfel mit einem Teilchendurchmesser von 70,0 nm und einem Anteil von  $7,2 \pm 0,14\%$  am Gesamtvolumen. Das zweite Kurvenmaximum liegt bei einem Teilchendurchmesser von 284,0 nm mit einem Volumenanteil von  $4,1 \pm 0,03\%$ . Der dritte Kurvengipfel liegt mit einem Teilchendurchmesser von 657,0 nm mit einem Volumenanteil am Gesamtvolumen von  $1,1 \pm 0,05\%$ . Die größten Teilchendurchmesser betragen 953,0 nm mit einem Volumenanteil von weniger als 0,01 %.

Die bei einer Temperatur von 60°C ausgesetzten funktionalisierten magnetischen Nanopartikel zeigen ein erstes Kurvenmaximum bei einem Partikeldurchmesser von 70,0 nm mit einem Volumenanteil von  $5,6 \pm 0,03\%$  und ein zweites bei 284,0 nm mit einem Volumenanteil von  $4,4 \pm 0,03\%$  des Gesamtvolumens. Ein weiterer Kurvengipfel liegt bei einem Volumenanteil von  $1,6 \pm 0,05\%$  und einem Teilchendurchmesser von 657,0 nm. Ein vierter Kurvengipfel zeigt sich bei einem Teilchendurchmesser von 1832,0 nm und einem Volumenanteil von  $1,1 \pm 0,01\%$  des gemessenen Volumens. Die größten Teilchendurchmesser betragen 4241,0 nm bei einem Volumenanteil von unter 0,01 %.

Eine zusammenfassende Volumengrößenverteilung der durchgeführten Versuche und deren unbehandelten nativen magnetischen Nanopartikel ist in der nachfolgenden Tabelle (Tab.: 3) dargestellt.



**Tab.: 3**      **Volumenverteilung der funktionalisierten magnetischen Nanopartikel unbehandelt (bei RT) und nach fünfstündiger Exposition bei Temperaturen von 40 und 60°C. Die gemessenen Teilchendurchmesser beziehen sich auf den Durchmesser der Partikel einschließlich deren Hydrathülle und wurden mit einem Laserdiffraktometer bestimmt. Alle Versuchsansätze wurden mindestens dreimal gemessen und die Experimente durch einen Wiederholungsversuch bestätigt. (MNP: Magnetische NanoPartikel)**

Volumen- verteilung %<	Funktionalisierte MNP Teilchendurchmesser (nm)		
	Nach fünfstündiger Exposition bei		
	4°C	40°C	60°C
	(unbehandelt)		
<b>10</b>	54,7 ±<0,001	53,8 ±<0,001	57,0 ±<0,001
<b>25</b>	69,6 ±<0,001	68,2 ±<0,001	74,8 ±<0,001
<b>50</b>	97,0 ±<0,001	95,5 ±<0,001	127,3 ±<0,001
<b>75</b>	157,6 ±<0,001	215,7 ±<0,001	303,8 ±<0,001
<b>90</b>	259,1 ±<0,001	326,7 ±<0,001	709,3 ±<0,001

Als eine weitere Auswertung der Messergebnisse ist der Teilchendurchmesser in Abhängigkeit des Teilchenanteiles abgebildet (Abb.: 12/B).

Der größte Anteil der funktionalisierten magnetischen Nanopartikel liegt mit einem Teilchenanteil von  $13,3 \pm 0,05$  % mit einem Teilchendurchmesser von 48,0 nm. Wenige Teilchen (unter 0,01 %) haben einen Partikeldurchmesser von 496,0 nm.

Die funktionalisierten magnetischen Nanopartikel, die einer Temperatur von 40°C ausgesetzt waren, zeigen den höchsten Anteil an Teilchen ( $13,9 \pm 0,04$  %) mit einem Durchmesser von 48,0 nm und zeigen einen Teilchenanteil von unter 0,01 % bei einem Teilchendurchmesser von 953,0 nm.

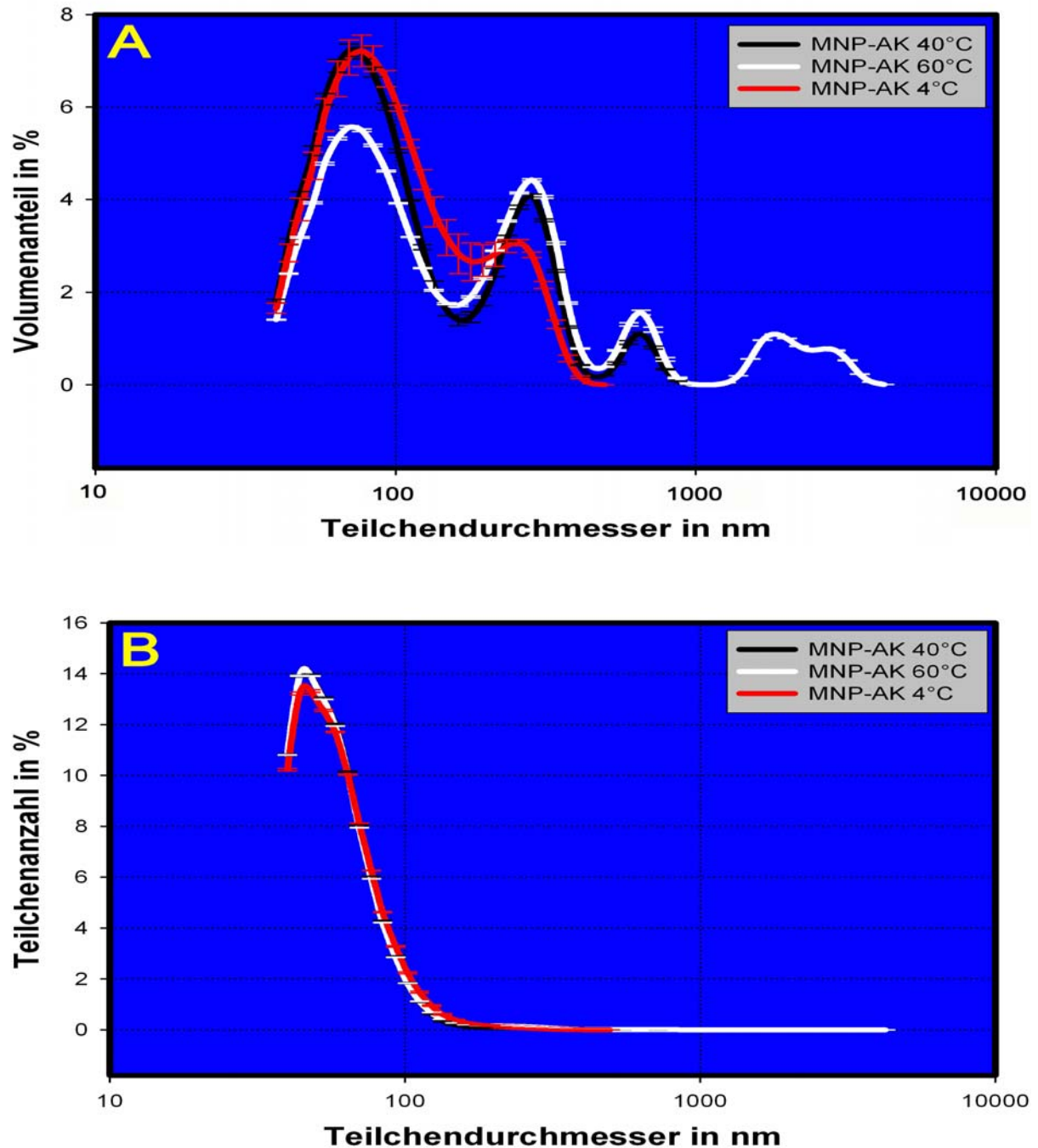


Abb.: 12 Teilchengrößenverteilung funktionalisierter magnetischer Nanopartikel nach fünfmonatiger Exposition von verschiedenen Temperaturen: Schaubild **A** zeigt den Volumenanteil in Abhängigkeit der Teilchendurchmesser. Schaubild **B** zeigt den Teilchenanteil in Abhängigkeit der Teilchendurchmesser. Die gemessenen Teilchendurchmesser beziehen sich auf den Durchmesser der Partikel einschließlich deren Hydrathülle und wurden mit einem Laserdiffraktometer bestimmt. Alle Messungen wurden sechsmal wiederholt und die Experimente durch einen Wiederholungsversuch bestätigt. (MNP: Magnetische NanoPartikel, AK: AntiKörper)

---

Die mit einer Temperatur von 60°C behandelten funktionalisierten magnetischen Nanopartikel zeigten bei  $13,9 \pm 0,01$  % aller gezählten Teilchen einen Teilchendurchmesser von 44,0 nm. Ein zweites Kurvenmaximum liegt bei einem Teilchendurchmesser von 1669,0 nm mit einem Anteil an Teilchen von unter 0,01 %. Die größten Teilchen sind mit einem Anteil von weniger als 0,01 % des Gesamtprozentsatzes aller gemessenen Teilchen 4241,0 nm groß.

## **6.2 Einfluss der Lyophilisierung auf die Teilchengröße nativer magnetischer Nanopartikel**

Nach fünfstündigem Einengen einer Suspension nativer magnetischer Nanopartikel mit Hilfe eines Lyophilisators ergab die Bestimmung der Teilchendurchmesser mittels eines Laserdiffraktometers eine deutliche Vergrößerung der Teilchendurchmesser. Die genannten Teilchendurchmesser entsprechen den Durchmessern der Partikel einschließlich deren Hydrathülle. Die Verläufe der Kurven der Teilchengröße in Abhängigkeit der Volumenverteilung (Abb.: 13/A) weisen zwei Gipfel auf.

Die Teilchendurchmesser der nativen nicht lyophilisierten magnetischen Nanopartikel, die als Vergleich dienen, bilden mit  $7,5 \pm 0,064$  % bei einem Teilchendurchmesser von 77,0 nm den höchsten Volumenanteil am Gesamtvolumen der Kurve. Das Maximum des zweiten Kurvengipfels liegt mit einem Partikeldurchmesser 311,0 nm bei einem Volumenanteil von  $2,5 \pm 0,02$  %. Die größten Teilchendurchmesser betragen 496,0 nm bei einem Volumenanteil von unter 0,01 %. Der lyophilisierte Versuchsansatz zeigt ein erstes Kurvenmaximum bei einem Teilchendurchmesser von 134,0 nm und einem Anteil am Gesamtvolumen von  $1,1 \pm 0,06$  %. Der zweite Kurvengipfel liegt bei einem Teilchendurchmesser von 5111,0 nm und einem Volumenanteil von  $5,1 \pm 0,001$  %. Die größten Teilchendurchmesser betragen 122 µm und weisen einen geringen Volumenanteil von 0,01 % auf.

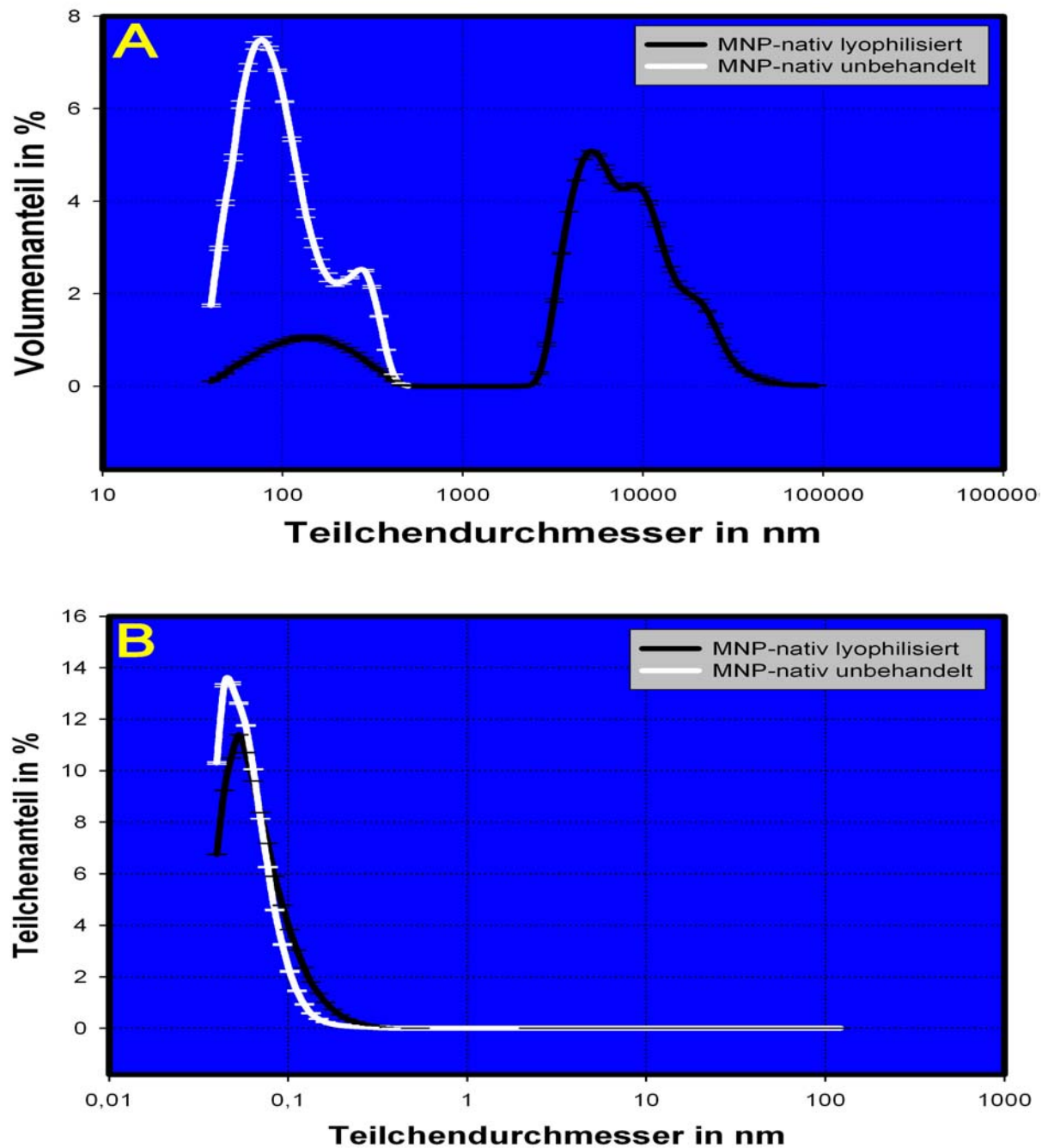


Abb.: 13 Teilchengrößenverteilung nativer magnetischer Nanopartikel in unbehandeltem Zustand und nach Lyophilisierung: Schaubild **A** zeigt den Volumenanteil in Abhängigkeit der Teilchendurchmesser. Schaubild **B** zeigt den Teilchenanteil in Abhängigkeit der Teilchendurchmesser. Die gemessenen Teilchendurchmesser beziehen sich auf den Durchmesser der Partikel einschließlich deren Hydrathülle und wurden mit einem Laserdiffraktometer bestimmt. Alle Messungen wurden sechsmal wiederholt und die Experimente durch einen Wiederholungsversuch bestätigt. (MNP: Magnetische NanoPartikel)

In einer weiteren Auswertungsform der Messergebnisse ist der Teilchendurchmesser in Abhängigkeit des Teilchenanteiles abgebildet (Abb.: 13/B).

Der größte Teilchenanteil der nativen nicht lyophilisierten magnetischen Nanopartikel liegt mit  $13,4 \pm 0,05$  % bei einem Teilchendurchmesser von 48,0 nm. Wenige Teilchen bilden mit einem Anteil von unter 0,01 % der gemessenen Gesamtzahl der Teilchen Partikel von einer Größe bis zu 496,0 nm.

Der lyophilisierte Versuchsansatz zeigt die höchste Teilchenanzahl ( $11,4 \pm 0,001$  %) bei einem Teilchendurchmesser von 53,0 nm. Ein zweites Kurvenmaximum ist bei einem Teilchenanteil von unter 0,01 % bei einem Partikeldurchmesser von 3519,0 nm zu finden. Die größten Teilchen zeigen mit einem kleinen Prozentsatz von unter 0,01 % Partikeldurchmesser von 122  $\mu\text{m}$ .

Ein prozentualer Überblick der lyophilisierten nativen magnetischen Nanopartikel zeigt, in der Tabelle 4, die Volumenverteilung des durchgeführten Versuches und ist denen der nativen magnetischen Nanopartikel gegenübergestellt.

**Tab.: 4** Die Volumenverteilung nativer magnetischer Nanopartikel nach Verdünnung mit PBS und nachfolgender Einengung mittels Lyophilisation im Vergleich zu nativen nicht lyophilisierten magnetischen Nanopartikeln. Die gemessenen Teilchendurchmesser beziehen sich auf den Durchmesser der Partikel einschließlich deren Hydrathülle und wurden mit einem Laserdiffraktometer bestimmt. Alle Versuchsansätze wurden mindestens dreimal gemessen und die Experimente durch einen Wiederholungsversuch bestätigt. (MNP: Magnetische NanoPartikel)

Volumenverteilung %<	Native MNP Teilchendurchmesser (nm)	
	nicht lyophilisiert	lyophilisiert
<b>10</b>	$54,3 \pm 0,001$	$167,5 \pm 0,001$
<b>25</b>	$68,7 \pm 0,001$	$4108,1 \pm 0,001$
<b>50</b>	$94,3 \pm 0,001$	$6683,9 \pm 0,001$
<b>75</b>	$146,3 \pm 0,001$	$11430,0 \pm 0,001$
<b>90</b>	$255,7 \pm 0,001$	$18900,0 \pm 0,001$

### 6.3 Lagerung nativer und funktionalisierter magnetischer Nanopartikel

Nach fünfmonatiger Lagerung von nativen und funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln zeigten die nur funktionalisierten Nanopartikel eine Vergrößerung der Teilchendurchmesser (siehe Abb.: 14/A und B; Tab.5). Im Gegensatz dazu war bei den nativen Nanopartikeln keine Veränderung der Partikeldurchmesser zu beobachten.

Die Teilchendurchmesser nicht gelagerten nativen magnetischen Nanopartikeln bilden mit einem Partikeldurchmesser von 77,0 nm bei einem  $7,45 \pm 0,06$  %igen Anteil am Gesamtvolumen einen ersten Kurvengipfel. Das zweite Kurvenmaximum liegt mit einem Teilchendurchmesser von 284,0 nm bei einem Volumenanteil von  $2,5 \pm 0,02$  % des gemessenen Gesamtvolumens. Die größten Teilchendurchmesser betragen 496,0 nm und weisen einen geringen Volumenanteil von unter 0,01 % auf.

**Tab.: 5**      **Volumenverteilung neu hergestellter nativer magnetischer Nanopartikel zu denselben nativen magnetischen Nanopartikeln nach 5 Monaten Lagerung bei 4°C und die Volumenverteilung funktionalisierter magnetischer Nanopartikel zu denselben funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln nach 5 Monaten Lagerung bei 4°C. Die gemessenen Teilchendurchmesser beziehen sich auf den Durchmesser der Partikel einschließlich deren Hydrathülle und wurden mit einem Laserdiffraktometer bestimmt. Alle Versuchsansätze wurden mindestens dreimal gemessen und die Experimente durch einen Wiederholungsversuch bestätigt. (MNP: Magnetische NanoPartikel)**

Volumen- verteilung %<	Native MNP Teilchendurchmesser (nm)		Funktionalisierte MNP Teilchendurchmesser (nm)	
	Neu hergestellt	Nach 5 Monaten	Neu hergestellt	Nach 5 Monaten
<b>10</b>	54,3 $\pm > 0,001$	53,3 $\pm < 0,001$	0,054,7 $\pm < 0,001$	56,3 $\pm < 0,001$
<b>25</b>	68,7 $\pm < 0,001$	66,5 $\pm < 0,001$	0,069,6 $\pm < 0,001$	73,0 $\pm < 0,001$
<b>50</b>	94,3 $\pm < 0,001$	89,5 $\pm < 0,001$	0,097,0 $\pm < 0,001$	109,5 $\pm < 0,001$
<b>75</b>	146,3 $\pm < 0,001$	133,8 $\pm < 0,001$	0,157,6 $\pm < 0,001$	219,7 $\pm < 0,001$
<b>90</b>	255,7 $\pm < 0,001$	262,3 $\pm < 0,001$	0,259,1 $\pm < 0,001$	332,0 $\pm < 0,001$

---

Nach fünfmonatiger Lagerung zeigten dieselben nativen magnetischen Nanopartikel folgende Teilchendurchmesser. Den höchsten Volumenanteil machten magnetische Nanopartikel mit einem Teilchendurchmesser von 77,0 nm ( $7,9 \pm 0,05$  %) aus, gefolgt von 284,0 nm ( $2,7 \pm 0,02$  %). Den kleinsten Volumenanteil (unter 0,01%) machten magnetische Nanopartikel mit einem Durchmesser von 496,0 nm aus.

Die Teilchendurchmesser der funktionalisierten magnetischen Nanopartikel unmittelbar nach Herstellung ergeben Teilchendurchmesser von 77,0 nm und einem Volumenanteil von  $7,2 \pm 0,34$  % am Gesamtvolumen und somit das erste Kurvenmaximum. Der zweite Kurvengipfel liegt bei 258,0 nm mit einem Volumenanteil von  $3,1 \pm 0,07$  %. Die größten Teilchendurchmesser betragen 496,0 nm bei einem Volumenanteil von unter 0,01 %.

Nach fünf Monaten zeigten dieselben funktionalisierten magnetischen Nanopartikel vergrößerte Teilchendurchmesser. Die Teilchendurchmesser bilden mit 77,0 nm und einem Volumenanteil von  $6,2 \pm 0,16$  % des Gesamtvolumens den ersten Kurvengipfel. Das zweite Kurvenmaximum liegt mit einem Volumenanteil von  $3,7 \pm 0,02$  % bei einem Teilchendurchmesser von 284,0 nm. Ein dritter Kurvengipfel liegt bei einem Partikeldurchmesser von 657,0 nm mit einem Volumenanteil von  $1,3 \pm 0,02$  %. Bei einem geringen Volumenanteil von unter 0,01 % liegen die größten Teilchendurchmesser mit 953,0 nm.

Wird der Teilchenanteil in Abhängigkeit des Teilchendurchmessers dargestellt, ergeben sich folgende Werte (siehe Abb. 14/B).

Der größte Teilchenanteil der ungelagerten nativen magnetischen Nanopartikel liegt mit  $13,4 \pm 0,05$  % bei einem Teilchendurchmesser von 48,0 nm. Wenige Teilchen sind mit einem Anteil von unter 0,01 % bis zu 496,0 nm groß.

Nach fünfmonatiger Lagerung zeigt dieser Versuchsansatz den höchsten Teilchenanteil mit  $13,7 \pm 0,03$  % bei einem Teilchendurchmesser von 48,0 nm. Einige Teilchen weisen mit einem Anteil von unter 0,01 % an der Gesamtzahl der gemessenen Teilchen einen Partikeldurchmesser von 496,0 nm auf.

Das Maximum der ungelagerten funktionalisierten magnetischen Nanopartikel liegt mit einem Teilchenanteil von  $13,3 \pm 0,06$  % bei einem Teilchendurchmesser von 48,0 nm. Mit einem geringen Teilchenanteil von unter 0,01 % zeigen einige Teilchen einen Durchmesser von 496,0 nm.

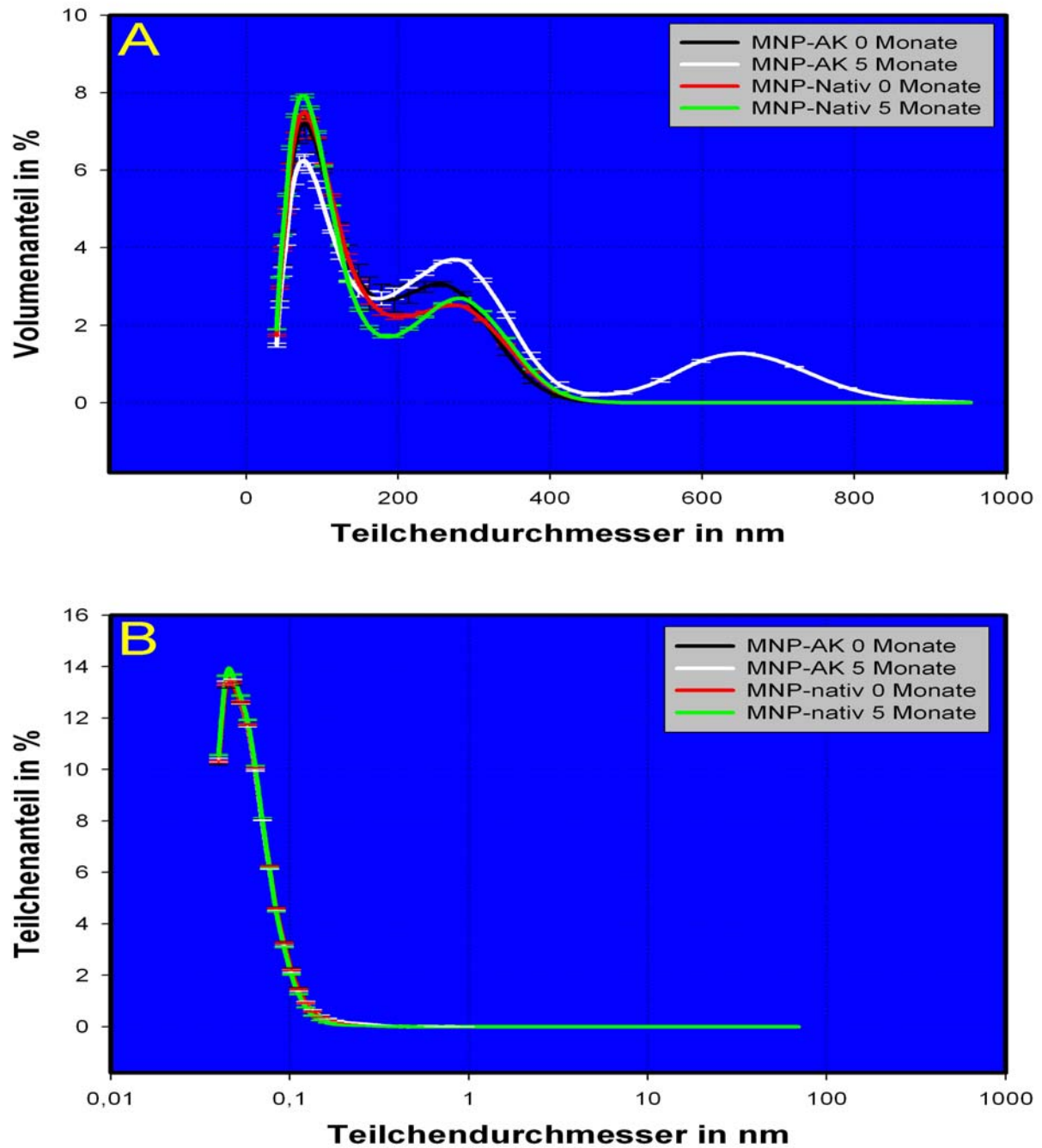


Abb.: 14 Teilchengrößenverteilung nativer und funktionalisierter magnetischer Nanopartikel in neuem Zustand und nach fünfmonatiger Lagerung: Schaubild **A** zeigt den Volumenanteil in Abhängigkeit der Teilchendurchmesser. Schaubild **B** zeigt den Teilchenanteil in Abhängigkeit der Teilchendurchmesser. Die gemessenen Teilchendurchmesser beziehen sich auf den Durchmesser der Partikel einschließlich deren Hydrathülle und wurden mit einem Laserdiffraktometer bestimmt. Alle Messungen wurden sechsmal wiederholt und die Experimente durch einen Wiederholungsversuch bestätigt. (MNP: Magnetische NanoPartikel, AK: AntiKörper)



---

Nach fünf Monaten Lagerung zeigt der funktionalisierte Versuchsansatz die höchste Teilchenanzahl von  $13,4 \pm 0,08$  % bei einem Teilchendurchmesser von 48,0 nm. 5% aller gezählten Teilchen hatten Durchmesser größer als 953,0 nm.

#### **6.4 Tauglichkeit verschiedener Verfahren zur Abtrennung ungebundener Antikörper**

Als Verfahren zur Reinigung von ungebundenen Antikörpern kamen die Trennung mit Hilfe eines Dauermagneten, eine Reinigung mittels Gelfiltration (Sephadex G100) und eine Teilchengrößenseparation (Miltenyi-Säule), zur Anwendung. Um die Streuung der Messergebnisse möglichst gering zu halten, wurden die verschiedenen Versuchsansätze mehrmals mit Hilfe eines Laserdiffraktometer gemessen. Die Ergebnisse der verschiedenen Experimente konnten durch einen Wiederholungsversuch bestätigt werden.

Die Messungen ergaben, dass alle Verfahren (Gelfiltration und Teilchengrößenseparation), außer der Reinigung mittels eines Dauermagneten, zu einer deutlichen Vergrößerung der Teilchendurchmesser führen (siehe Abb. 15/A und B).

Die Teilchendurchmesser der nativen unbehandelten magnetischen Nanopartikel bilden mit einem Teilchendurchmesser von 77,0 nm bei einem Volumenanteil von  $7,5 \pm 0,06$  % des gesamten Volumens den höchsten Punkt des ersten Kurvengipfels. Der zweite Kurvengipfel liegt mit einem Teilchendurchmesser 311,0 nm bei einem Volumenanteil von  $2,5 \pm 0,02$  %. Die größten Teilchendurchmesser betragen 496,0 nm bei einem Volumenanteil von unter 0,01 %.

Die funktionalisierten und mittels eines Dauermagneten gereinigten magnetischen Nanopartikel zeigen einen ersten Kurvengipfel bei einem Partikeldurchmesser von 77,0 nm mit einem Volumenanteil von  $7,2 \pm 0,34$  % des Gesamtvolumens und einen zweiten bei einem Teilchendurchmesser von 258,0 nm mit einem Volumenanteil von  $3,1 \pm 0,07$  %. Die größten Teilchendurchmesser betragen 496,0 nm bei einem geringen Volumenanteil von unter 0,01 %.

Der mit Gelfiltration von überschüssigen Antikörpern befreite Versuchsansatz funktionalisierter magnetischer Nanopartikel weist mit einer Teilchengröße von 258,0 nm bei einem Volumenanteil von  $2,2 \pm 0,12$  % des gemessenen Volumens ein

erstes Kurvenmaximum auf. Das zweite Kurvenmaximum liegt bei einem großen Teilchendurchmesser von 3862,0 nm bei einem Volumenanteil von  $4,3 \pm 0,16$  %. Die größten Teilchen weisen einen sehr großen Durchmesser von 17180,0 nm mit einem kleinen Volumenanteil von unter 0,01 % auf.

Die Teilchendurchmesser der funktionalisierten magnetischen Nanopartikel, die mit dem Verfahren der Teilchengrößenseparation von ungebundenen Antikörpern getrennt wurden, ergaben ein erstes Kurvenmaximum bei einem Teilchendurchmesser von 134,0 nm und einem Volumenanteil von  $0,8 \pm 7,09 \cdot 10^{-3}$  % des Gesamtvolumens. Das zweite liegt mit einem großen Partikeldurchmesser von 5111,0 nm bei einem Volumenanteil von  $5,9 \pm 0,01$  %. Die größten Teilchendurchmesser betragen 57770,0 nm bei einem geringen Volumenanteil von unter 0,01 %.

Eine zusammenfassende Volumengrößenverteilung der durchgeführten Versuche und der unbehandelten nativen magnetischen Nanopartikel ist in der nachfolgenden Tabelle (Tab.:6) dargestellt.

**Tab.: 6**      **Volumenverteilungen funktionalisierter magnetischer Nanopartikel, nach der Abtrennung überschüssiger Antikörper mittels Dauermagnet, Gelfiltration (Sephadex G100) und Teilchengrößenseparation (Miltenyi-Säule) und Volumenverteilung nativer unbehandelter magnetischer Nanopartikel. Die gemessenen Teilchendurchmesser beziehen sich auf den Durchmesser der Partikel einschließlich deren Hydrathülle und wurden mit einem Laserdiffraktometer bestimmt. Alle Versuchsansätze wurden mindestens dreimal gemessen und die Experimente durch einen Wiederholungsversuch bestätigt. (MNP: Magnetische NanoPartikel, AK: AntiKörper)**

Volumenverteilung %<	Native MNP Teilchen-durchmesser (nm)	MNP-AK		
		Teilchendurchmesser (nm)		
		Dauermagnet	Gelfiltration	Teilchensep.
<b>10</b>	54,3 $\pm < 0,001$	54,7 $\pm < 0,001$	95,7 $\pm < 0,001$	222,5 $\pm < 0,001$
<b>25</b>	68,7 $\pm < 0,001$	69,6 $\pm < 0,001$	181,8 $\pm 0,03$	40912 $\pm 0,01$
<b>50</b>	94,3 $\pm < 0,001$	97,0 $\pm < 0,001$	919,0 0,3	6190,2 $\pm < 0,01$
<b>75</b>	146,3 $\pm < 0,001$	157,6 $\pm < 0,001$	2681,5 $\pm 0,5$	10833,3 $\pm 0,03$
<b>90</b>	255,7 $\pm 0,001$	259,1 $\pm < 0,001$	3960,0 $\pm 0,7$	19015,0 $\pm 0,1$

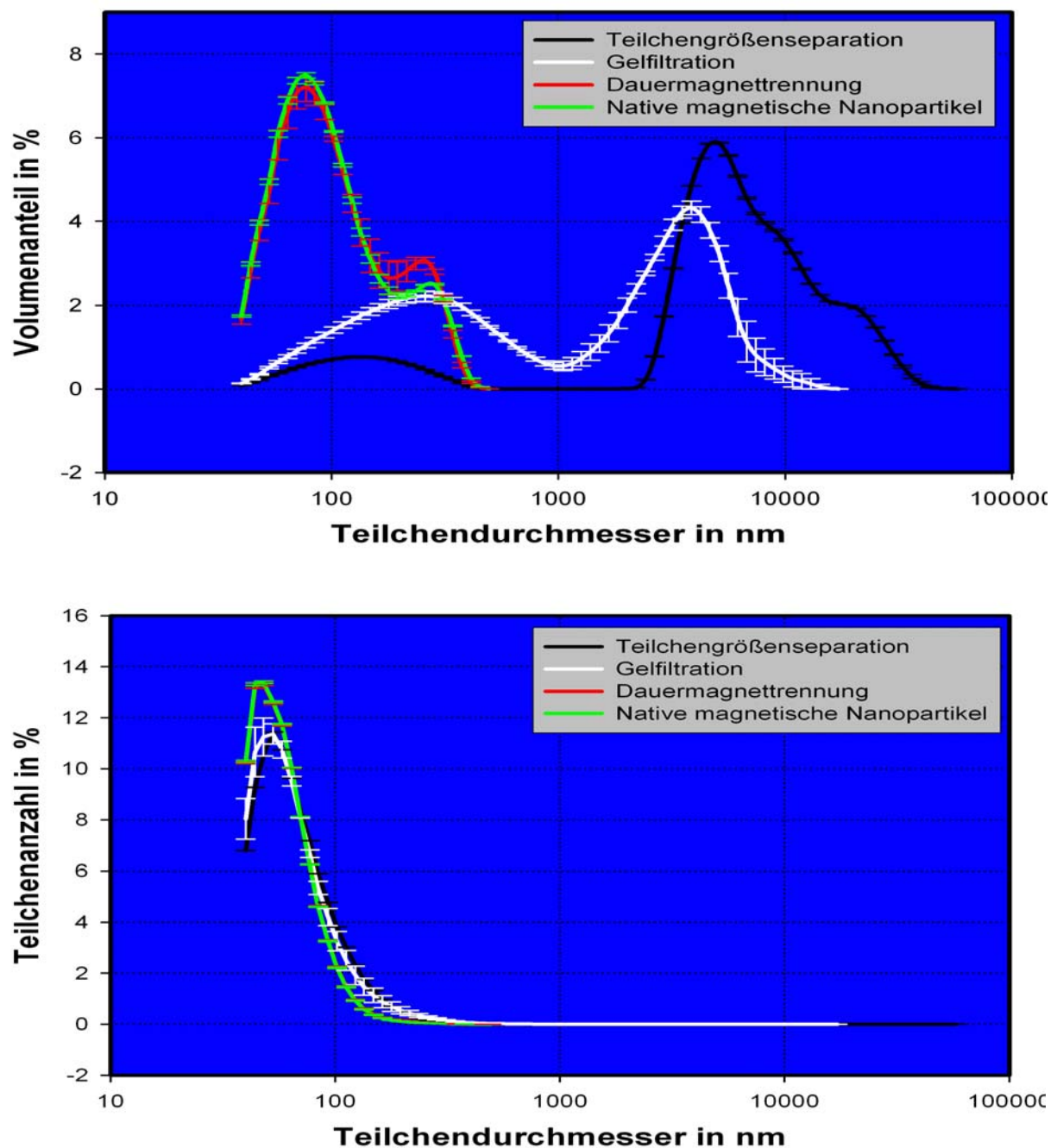


Abb.: 15 Teilchengrößenverteilung nativer magnetischer Nanopartikel und funktionalisierter magnetischer Nanopartikel nach Reinigung von ungebundenen Antikörpern mit verschiedenen Trennverfahren: Schaubild **A** zeigt den Volumenanteil in Abhängigkeit der Teilchendurchmesser. Schaubild **B** zeigt den Teilchenanteil in Abhängigkeit der Teilchendurchmesser. Die gemessenen Teilchendurchmesser beziehen sich auf den Durchmesser der Partikel einschließlich deren Hydrathülle und wurden mit einem Laserdiffraktometer bestimmt. Alle Messungen wurden sechsmal wiederholt und die Experimente durch einen Wiederholungsversuch bestätigt.

---

Wird in einer weiteren Auswertungform der Teilchenanteil in Abhängigkeit der Teilchengröße dargestellt (siehe Abb. 15/B), ergeben sich folgende Ergebnisse.

Der größte Anteil der nativen magnetischen Nanopartikel liegt mit  $13,4 \pm 0,05$  % bei einem Teilchendurchmesser von 48,0 nm. Wenige Teilchen (unter 0,01 %) zeigen einen Durchmesser von 496,0 nm.

Die funktionalisierten magnetischen Nanopartikel, die mittels eines Dauermagneten gereinigt wurden, zeigen den größten Teilchenanteil von  $13,3 \pm 0,06$  % bei einem Teilchendurchmesser von 48,0 nm. Die größten Teilchen mit einem Durchmesser von 496,0 nm weisen einen geringen Prozentsatz von unter 0,01 % der gemessenen Anzahl an Teilchen auf.

Der mit Gelfiltration von überschüssigen Antikörpern befreite Versuchsansatz funktionalisierter magnetischer Nanopartikel weist die höchste Teilchenanzahl bei  $11,4 \pm 0,4$  % vom Gesamtanteil aller gemessenen Teilchen bei einem Teilchendurchmesser von 53,0 nm auf. Weniger als 0,01 % aller gemessenen Teilchen zeigen einen großen Durchmesser von 2010,0 nm. Die größten Teilchen werden mit einem kleinen Anteil von weniger als 0,01 % bis zu 17180 nm groß.

Die funktionalisierten magnetischen Nanopartikel, die mit dem Verfahren der Teilchengrößenseparation von ungebundenen Antikörpern getrennt wurden, ergaben den größten Anteil von  $11,4 \pm 0,001$  % aller Teilchen bei einem Teilchendurchmesser von 53,0 nm. Ein weiteres Kurvenmaximum liegt bei einem Teilchenanteil von unter 0,01 % mit einem Partikeldurchmesser von 3862,0 nm. Einige Teilchen ergaben sogar Teilchengrößen von 58  $\mu\text{m}$  mit einem geringen Anteil an der Gesamtzahl der Teilchen von unter 0,01 %.

---

## **6.5 Einfluss verschiedener Antikörperkonzentrationen auf funktionalisierte magnetische Nanopartikel**

### **6.5.1 Auswirkungen auf die Teilchengrößenverteilung funktionalisierter magnetischer Nanopartikel**

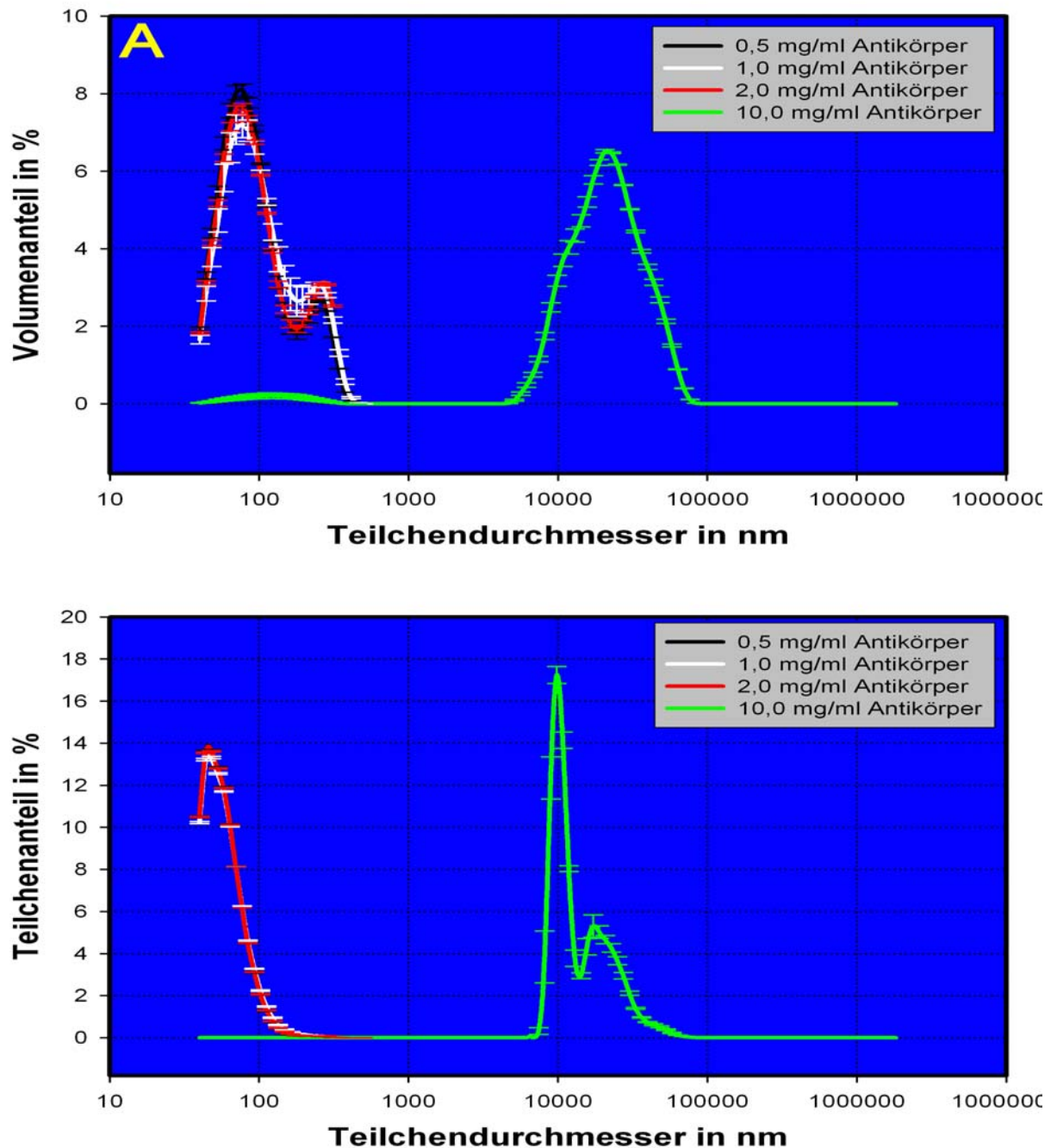
Eine Variation der eingesetzten Antikörpermenge zeigte eine deutliche Vergrößerung der Teilchendurchmesser bei einer eingegebenen Antikörperkonzentration von 10 mg/ml (siehe Abb. 16/A und B). Die anderen Antikörperkonzentrationen (0,5/1,0/2,0 mg/ml) zeigen keine Erhöhung der Teilchendurchmesser. Bei einer Antikörperkonzentration von 1,0 mg/ml zeigen sich im Vergleich mit nativen magnetischen Nanopartikeln keine vergrößerten Teilchen (siehe Abb. 15/A und B; funktionalisierte magnetische Nanopartikel mit einem Dauermagnet gereinigt und native magnetische Nanopartikel). Alle Versuchsansätze wurden durch ein Wiederholungsexperiment bestätigt und die Teilchendurchmesser mehrmals bestimmt, um mögliche Messabweichungen auszugleichen. Die erhaltenen Teilchendurchmesser entsprechen den Nanopartikeln einschließlich Hydrathülle.

Alle Kurvenverläufe (Volumenanteil/Teilchendurchmesser; Abb. 16/A) der verschiedenen Versuchsansätze bilden zwei Gipfel.

Die Teilchendurchmesser bei der zugegebenen Antikörperkonzentration von 0,5 mg/ml bilden mit einem Durchmesser von 77,0 nm bei einem Volumenanteil von  $8,1 \pm 0,16$  % am Gesamtvolumen den ersten Kurvengipfel. Der zweite Kurvengipfel liegt bei einem Teilchendurchmesser von 258,0 nm mit einem Volumenanteil von  $2,7 \pm 0,03$  %. Die größten Teilchendurchmesser betragen 452,0 nm und weisen einen geringen Volumenanteil von weniger als 0,01 % auf.

Der mit einer zugegebenen Antikörperkonzentration von 1,0 mg/ml inkubierte Versuchsansatz zeigt ein erstes Kurvenmaximum bei 77,0 nm mit einem Volumenanteil von  $7,2 \pm 0,34$  % am gemessenen Volumen und ein Zweites bei 258,0 nm bei einem Volumenanteil von  $3,1 \pm 0,07$  %. Die größten Teilchendurchmesser betragen 496,0 nm bei einem kleinen Volumenanteil von unter 0,01 %.

Die mit einer zugegebenen Antikörperkonzentration von 2,0 mg/ml funktionalisierten magnetischen Nanopartikel weisen mit einem Partikeldurchmesser von 77,0 nm bei einem Volumenanteil von  $8,3 \pm 0,26$  % des Gesamtvolumens ein erstes Kurvenmaximum auf. Der zweite Kurvengipfel liegt bei einem Teilchendurchmesser



**Abb.: 16** Teilchengrößenverteilung funktionalisierter magnetischer Nanopartikel, die mit verschiedenen Antikörpermengen hergestellt wurden: Schaubild **A** zeigt den Volumenanteil in Abhängigkeit der Teilchendurchmesser. Schaubild **B** zeigt den Teilchenanteil in Abhängigkeit der Teilchendurchmesser. Die gemessenen Teilchendurchmesser beziehen sich auf den Durchmesser der Partikel einschließlich deren Hydrathülle und wurden mit einem Laserdiffraktometer bestimmt. Alle Messungen wurden sechsmal und die Experimente durch einen Wiederholungsversuch bestätigt.

von 284,0 nm und einem Volumenanteil von  $2,6 \pm 0,04$  % des gemessenen Gesamtvolumens. Die größten Teilchen weisen einen Durchmesser von 496,0 nm auf und verfügen über einen kleinen Anteil am Gesamtvolumen von weniger als 0,01 %.

Die Teilchendurchmesser der funktionalisierten magnetischen Nanopartikel, die mit einer zugegebenen Antikörperkonzentration von 10,0 mg/ml inkubiert wurden, ergaben ein erstes Kurvenmaximum bei einem Teilchendurchmesser von 123,0 nm mit einem Volumenanteil von  $0,2 \pm 0,07$  % des Gesamtvolumens. Das Zweite liegt mit einem großen Teilchendurchmesser von 21  $\mu\text{m}$  bei einem Volumenanteil von  $6,5 \pm 0,04$  %. Die größten Teilchen betragen sogar 92  $\mu\text{m}$  im Durchmesser und haben einen kleinen Anteil von unter 0,01 % am Gesamtvolumen.

Eine zusammenfassende Volumengrößenverteilung der durchgeführten Versuche mit verschiedenen Ausgangsmengen an Antikörpern funktionalisierten magnetischen Nanopartikel ist in der nachfolgenden Tabelle (Tab.:7) dargestellt.

**Tab.: 7**      **Volumenverteilung der mit verschiedenen Ausgangsmengen an Antikörpern funktionalisierten magnetischen Nanopartikel. Die gemessenen Teilchendurchmesser beziehen sich auf den Durchmesser der Partikel einschließlich deren Hydrathülle und wurden mit einem Laserdiffraktometer bestimmt. Alle Versuchsansätze wurden mindestens dreimal gemessen und die Experimente durch einen Wiederholungsversuch bestätigt. (MNP: Magnetische NanoPartikel, AK: AntiKörper)**

Volumenverteilung %<	MNP-AK			
	Teilchendurchmesser (nm)			
	AK 0,5 mg/ml	AK 1,0 mg/ml	AK 2,0 mg/ml	AK 10,0 mg/ml
<b>10</b>	53,3 $\pm < 0,001$	54,7 $\pm < 0,001$	54,4 $\pm < 0,001$	16112,0 $\pm < 0,001$
<b>25</b>	66,0 $\pm < 0,001$	69,6 $\pm < 0,001$	68,9 $\pm < 0,001$	23336,0 $\pm < 0,001$
<b>50</b>	89,0 $\pm < 0,001$	97,0 $\pm < 0,001$	95,5 $\pm < 0,001$	32898,0 $\pm < 0,001$
<b>75</b>	132,3 $\pm < 0,001$	157,6 $\pm < 0,001$	15,9 $\pm < 0,001$	48680,0 $\pm < 0,001$
<b>90</b>	241,0 $\pm < 0,001$	259,1 $\pm < 0,001$	27,3 $\pm < 0,001$	60736,0 $\pm < 0,001$

---

Unter Betrachtung des Datenmaterials vom Gesichtspunkt der Abhängigkeit von dem Teilchenanteil ist der Teilchendurchmesser hier abgebildet (Abb.: 12/B).

Der größte Teilchenanteil bei einer zugegebenen Antikörperkonzentration von 0,5 mg/ml liegt mit  $13,6 \pm 0,06$  % aller gemessenen Teilchen bei einem Teilchendurchmesser von 48,0 nm. Wenige Teilchen mit einem Anteil von unter 0,01 % zeigen Durchmesser bis zu 452,0 nm.

Die mit einer Antikörperkonzentration von 1,0 mg/ml funktionalisierten magnetischen Nanopartikel zeigen den höchsten Teilchenanteil von  $13,3 \pm 0,06$  % mit einem Teilchendurchmesser von 48,0 nm. Die größten Teilchen zeigen mit einem Anteil von unter 0,01 % an der Gesamtteilchenmenge einen Teilchendurchmesser von 496,0 nm.

Der größte Anteil der mit 2,0 mg/ml an Antikörpern funktionalisierten magnetischen Nanopartikel liegt mit  $13,6 \pm 0,04$  % bei einem Teilchendurchmesser von 48,0 nm. Einige Teilchen sind bis zu 496,0 nm groß und zeigen einen geringen Teilchenanteil von weniger als 0,01 %.

Die mit einer Ausgangsmenge von 10,0 mg/ml an Antikörpern gekoppelten magnetischen Nanopartikel weisen den größten Teilchenanteil von  $17,2 \pm 0,4$  % mit einem Teilchendurchmesser von 9819,0 nm auf. Die größten Teilchen sind mit einem Anteil von unter 0,01 % aller gemessenen Teilchen sogar 92090,0 nm im Durchmesser groß.

#### **6.5.2 Einfluss auf die Antikörper-Bindungskapazität funktionalisierter magnetischer Nanopartikel**

Werden im Kopplungsansatz verschiedene Antikörpermengen angeboten, resultiert daraus folgende Anbindung an die magnetischen Nanopartikel. Für eine Antikörperkonzentration von 0,5 mg/ml ergab die Proteinbestimmung nach Bradford  $18 \pm 3$  µg/100µl an gebundenen Antikörpern. Die mit einer Antikörperkonzentration von 1,0 mg/ml und 2,0 mg/ml funktionalisierten Ansätze ergaben eine gekoppelte Antikörpermenge von  $34 \pm 7$  µg/100µl und  $34 \pm 5$  µg/100µl. Ferner zeigte der mit einer Antikörperkonzentration von 10,0 mg/ml gekoppelte Versuchsansatz eine gebundene Antikörperkonzentration von  $47 \pm 9$  µg/µl (siehe Abb.: 17).



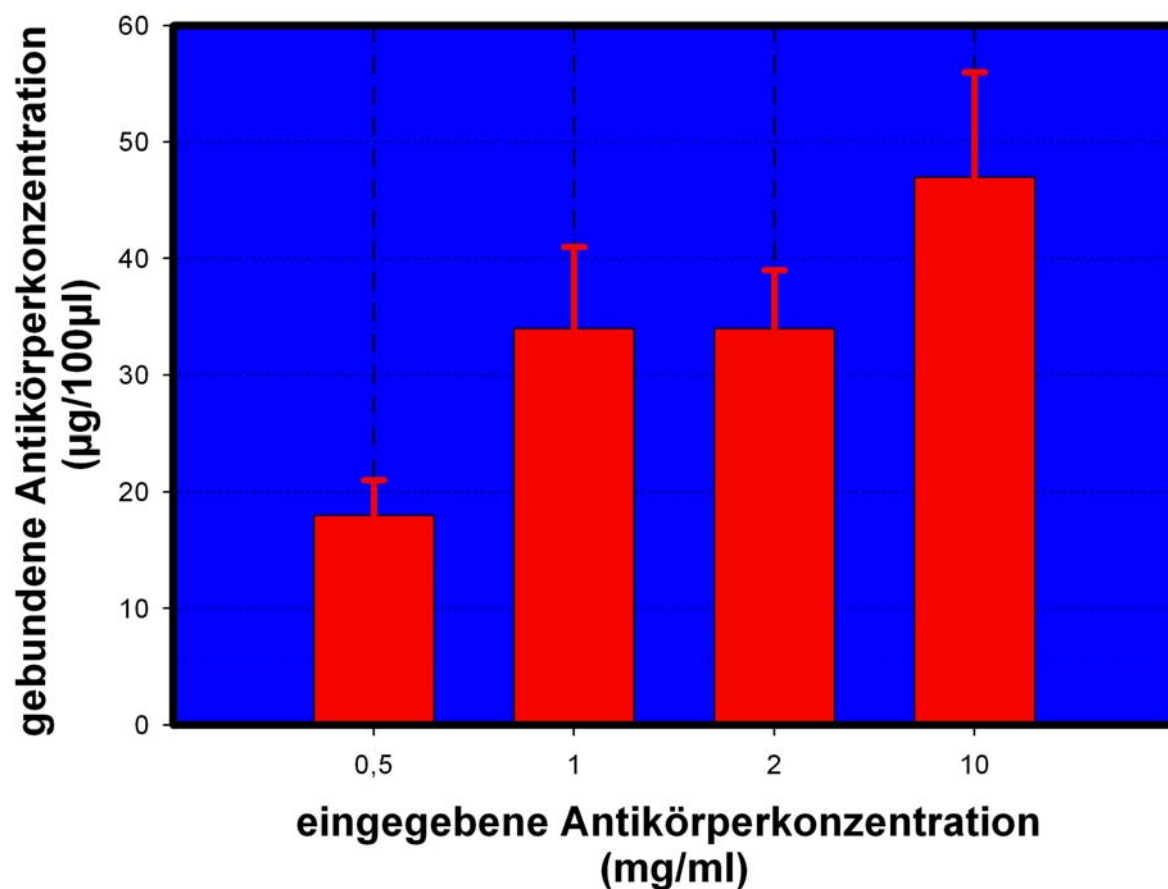


Abb.: 17 Die mit der Proteinbestimmung nach Bradford ermittelten gebundenen Antikörperkonzentrationen von funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln, nach der Abtrennung von ungekoppelten Antikörpern. Die angegebenen Antikörperkonzentrationen sind in Abhängigkeit der eingegeben Antikörperkonzentrationen dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen.

## 6.6 Einfluss der Menge an Kopplungsreagenz auf die Funktionalisierung magnetischer Nanopartikel mit Antikörpern

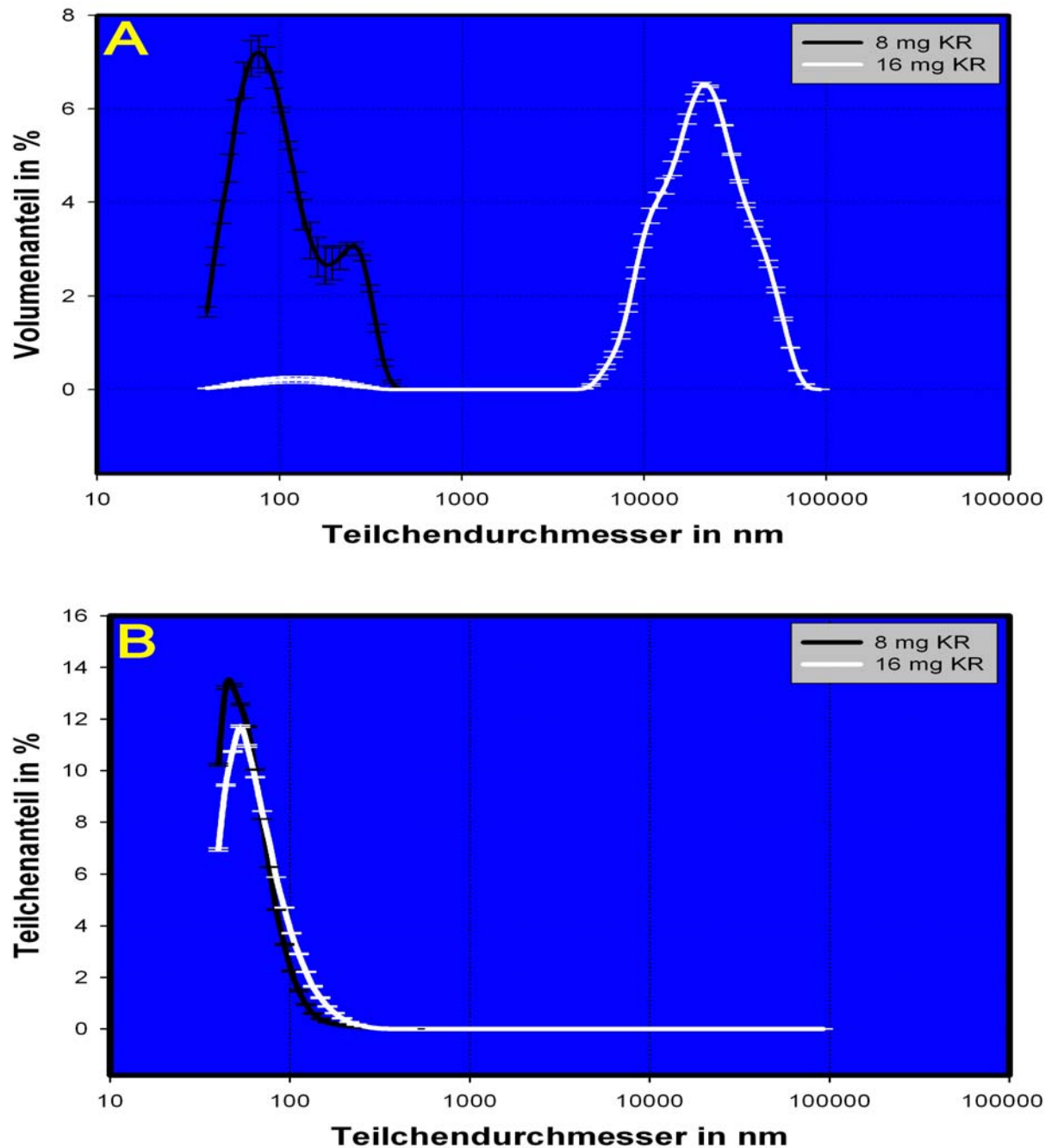
### 6.6.1 Auswirkung auf die Teilchengröße funktionalisierter magnetischer Nanopartikel

Die Erhöhung des Kopplungsreagenzes bei der Funktionalisierungsreaktion von 8 mg auf 16 mg führte zu stark erhöhten Teilchendurchmessern der funktionalisierten magnetischen Nanopartikel. Die Volumenverteilungskurven in Abhängigkeit der

Teilchengröße (siehe Abb.: 18/A) weisen zwei Gipfel auf, wobei der zweite Kurvengipfel des mit 16 mg an Kopplungsreagenz gekoppelten Versuchsansatzes, deutlich in Richtung größerer Teilchendurchmesser verschoben ist. Dies zeigt, dass nach der Kopplungsreaktion eine Erhöhung der Teilchendurchmesser, im Vergleich zu dem mit 8 mg an Kopplungsreagenz gekoppelten Versuchsansatzes, stattgefunden hat. Diese Teilchendurchmesser entsprechen dem Durchmesser der magnetischen Nanopartikel einschließlich Hydrathülle. Alle Messungen wurden mehrmals durchgeführt um Abweichungen der einzelnen Messzyklen auszugleichen. Dieses Ergebnis konnte durch einen Wiederholungsversuch bestätigt werden. In der folgenden Tabelle (Tab.: 8) ist die Volumengrößenverteilung in Abhängigkeit der Teilchendurchmesser der durchgeführten Versuche zusammengefasst.

**Tab.: 8** Die Volumenverteilung funktionalisierter magnetischer Nanopartikel bei Verwendung von verschiedenen Mengen (8 mg und 16 mg) an Kopplungsreagenz. KR steht für Kopplungsreagenz. Die gemessenen Teilchendurchmesser beziehen sich auf den Durchmesser der Partikel einschließlich deren Hydrathülle und wurden mit einem Laserdiffraktometer bestimmt. Alle Messungen wurden mehrmals wiederholt und die Experimente durch einen Wiederholungsversuch bestätigt. (MNP: Magnetische NanoPartikel, AK: AntiKörper)

Volumenverteilung %<	MNP-AK Teilchendurchmesser (nm)	
	Menge an KR 8 mg	Menge an KR 16 mg
<b>10</b>	54,7 ±<0,001	9491,0 ±<0,001
<b>25</b>	69,6 ±<0,001	14076,7 ±<0,001
<b>50</b>	97,0 ±<0,001	21593,3 ±<0,001
<b>75</b>	157,6 ±<0,001	31873,3 ±<0,001
<b>90</b>	259,1 ±<0,001	45036,7 ±<0,001



**Abb.: 18** Teilchengrößenverteilung funktionalisierter magnetischer Nanopartikel, die mit verschiedenen Mengen an Kopplungsreagenz (KR) hergestellt wurden: Schaubild **A** zeigt den Volumenanteil/Teilchendurchmesser. Schaubild **B** zeigt den Teilchenanteil/Teilchendurchmesser. Die gemessenen Teilchendurchmesser beziehen sich auf den Durchmesser der Partikel einschließlich deren Hydrathülle und wurden mit einem Laserdiffraktometer bestimmt. Alle Messungen wurden sechsmal wiederholt und die Experimente durch einen Wiederholungsversuch bestätigt.

---

Die Teilchendurchmesser bei einer zugegebenen Menge an Kopplungsreagenz von 8 mg bilden mit einem Teilchendurchmesser von 77,0 nm und einem Volumenanteil von  $7,2 \pm 0,34$  % am Gesamtvolumen einen ersten Kurvengipfel. Der zweite liegt bei einem Teilchendurchmesser von 258,0 nm und einem Anteil von  $3,1 \pm 0,07$  % des gemessenen Volumens. Die größten Teilchendurchmesser betragen 496,0 nm und weisen einen kleinen Volumenanteil von unter 0,01 % auf.

Bei einer zugegebenen Menge an Kopplungsreagenz von 16 mg zeigt sich das erste Kurvenmaximum bei einem Partikeldurchmesser von 123,0 nm mit einem Volumenanteil von  $0,2 \pm 0,07$  % und ein zweites bei einem Durchmesser von 20  $\mu$ m mit einem Volumenanteil von  $6,5 \pm 0,04$  %. Die größten Teilchendurchmesser betragen 92  $\mu$ m und ergeben einen Volumenanteil von unter 0,01 %.

In einer weiteren Auswertung des Datenmaterials wird anstatt des Volumenanteils der Teilchenanteil in Abhängigkeit der Teilchendurchmesser dargestellt (siehe Abb. 18/B), es ergeben sich folgende Ergebnisse.

Der größte Anteil einer zugegebenen Menge an Kopplungsreagenz von 8 mg liegt mit einem Anteil von  $13,3 \pm 0,06$ % aller gemessene Teilchen bei einem Partikeldurchmesser von 48,0 nm. Wenige Teilchen ergeben einen Teilchendurchmesser von 496,0 nm und sind durch einen geringen Teilchenanteil von weniger als 0,01 % vertreten.

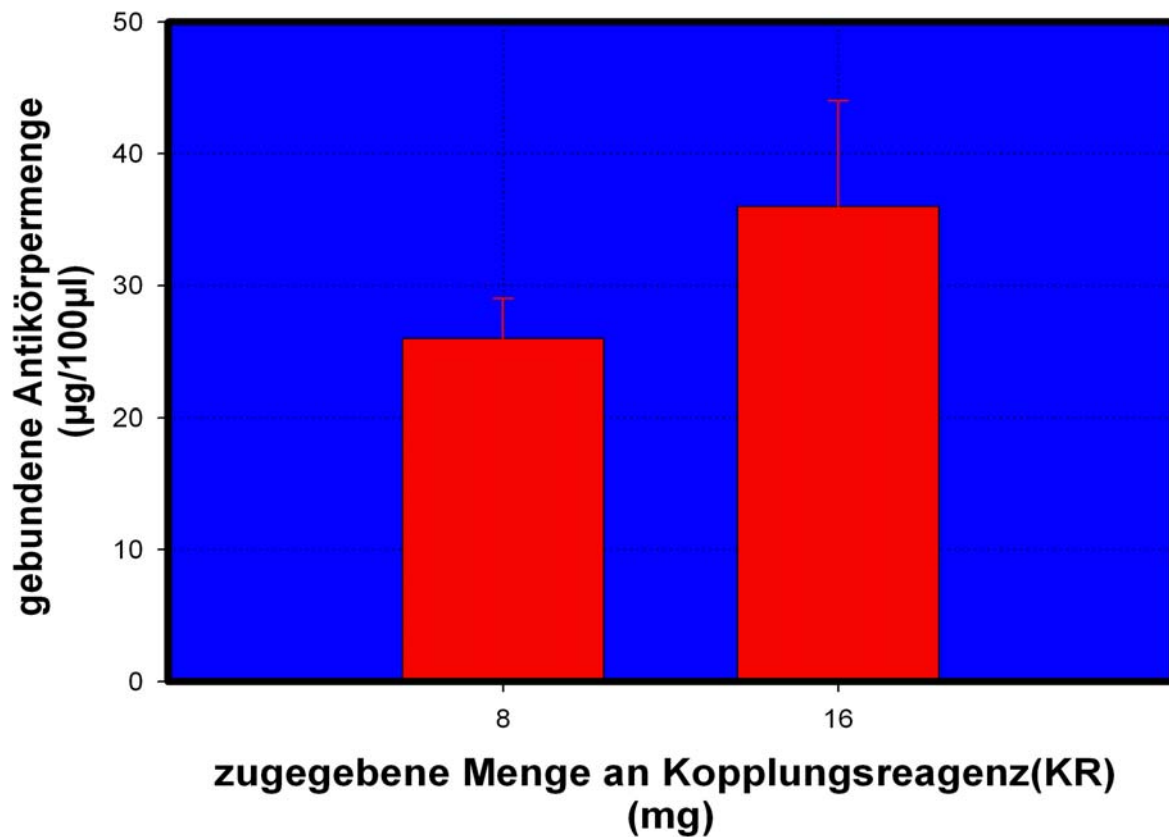
Die mit einer Menge an Kopplungsreagenz von 16 mg funktionalisierten magnetischen Nanopartikel zeigen den höchsten Teilchenanteil von  $11,7 \pm 0,04$  % bei einem Teilchendurchmesser von 53,0 nm. Ein zweites kleines Kurvenmaximum liegt mit einem Teilchenanteil von unter 0,01 % bei einem Durchmesser von 8944,0 nm. Die größten Teilchen werden sogar 92  $\mu$ m groß, mit einem geringen Anteil an der Gesamtmenge der Teilchen von weniger als 0,01 %.

#### **6.6.2 Einfluss auf die Antikörper-Bindungskapazität funktionalisierter magnetischer Nanopartikel**

Nach Variation der zugegebenen Menge an Kopplungsreagenz bei der Funktionalisierungsreaktion zeigte sich eine geringe Erhöhung der gebundenen Proteinmenge bei doppelter Menge an Kopplungsreagenz. Die gebundene Antikörpermenge wurde mit der Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt (siehe

---

Abb.: 19). Dies ergab eine Proteinmenge von  $26 \pm 3 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$  bei dem mit 8 mg an Kopplungsreagenz hergestellten Versuchsansatz.



**Abb.: 19** Die mit der Proteinbestimmung nach Bradford ermittelten gebundenen Antikörperkonzentrationen funktionalisierter magnetischer Nanopartikel nach der Abtrennung von ungekoppelten Antikörpern. Die gebundenen Antikörperkonzentrationen sind in Abhängigkeit der zugegebenen Mengen an Kopplungsreagenz dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen.

Bei einer zugegebenen Menge an Kopplungsreagenz von 16 mg, ergab sich eine gebundene Antikörperkonzentration von  $36 \pm 8 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Dies zeigt, dass sich durch eine Verdoppelung der Menge an Kopplungsreagenz keine Verdoppelung der gebundenen Antikörpermenge erreichen lässt.

---

## 6.6 Die Protein-Bindungskapazität magnetischer Nanopartikel in Abhängigkeit von der Antikörperinkubationszeit

Nach Inkubation von magnetischen Nanopartikeln mit Antikörpern für 15 Min., 30 Min., 60 Min., 90 Min., 120 Min., 150 Min. und 180 Min. wurde festgestellt, dass bis zu einer Antikörperinkubationszeit von 120 Min. die Menge der gebundenen Antikörper relativ konstant bleibt. Ab 120 Min. steigt die Menge der gebundenen Antikörper an, um schließlich bei einer Antikörperinkubationszeit von 180 Min. ihren Höhepunkt zu erreichen (siehe Abb.: 20). Daraus folgt, dass die im Grundprotokoll verwendete Antikörperinkubationszeit von 180 Min. nicht unterschritten werden kann, ohne eine geringere Menge an gebundenen Antikörpern zu erhalten.

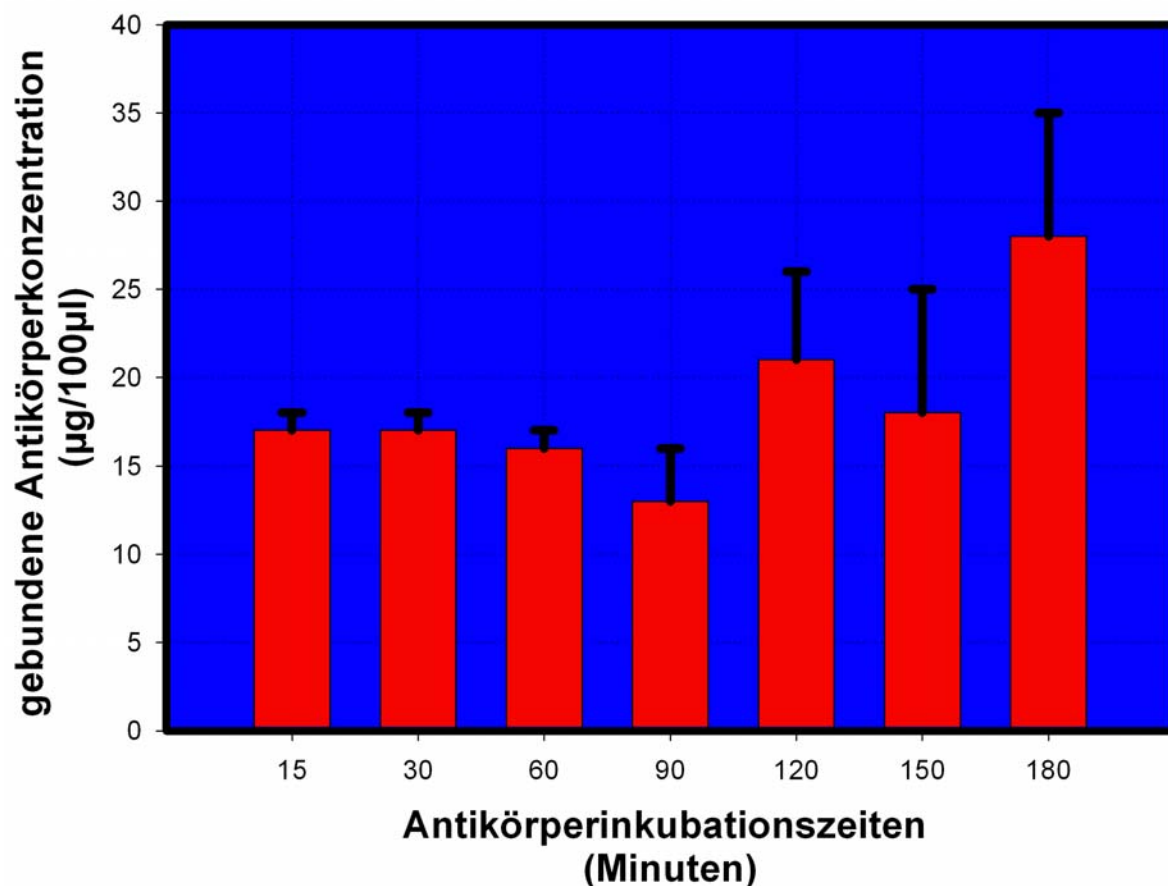


Abb.: 20 Die mit der Proteinbestimmung nach Bradford ermittelten gebundenen Antikörperkonzentrationen funktionalisierter magnetischer Nanopartikel in Abhängigkeit der verwendeten Antikörperinkubationszeiten nach der Reinigung von gebundenen Antikörpern. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen.

---

## 7 Diskussion

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass sich bei nativen (d.h. nicht mit einem Liganden, in dieser Arbeit ein Antikörper, verbundenen magnetischen Nanopartikeln, nach Exposition bei Temperaturen bis 60°C, keine Vergrößerung der Teilchengröße einstellt. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei mit einem Antikörper funktionalisierten (d.h. mit einem Liganden, in dieser Arbeit ein Antikörper, verbundenen magnetischen Nanopartikeln, eine Zunahme der Teilchendurchmesser nachdem die Partikel Temperaturen von 40° und 60°C ausgesetzt waren. Auch die Lyophilisation von nativen magnetischen Nanopartikeln führte zu großen Agglomeraten. Es zeigte sich, dass eine Lagerung von nativen magnetischen Nanopartikeln über einen Zeitraum von fünf Monaten möglich ist, ohne dass es zu einer Agglomeratbildung kommt. Hingegen führte eine Lagerung von funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln zu einer Vergrößerung der gemessenen Teilchen. Um nicht gebundene Antikörper von funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln abzutrennen, erwies sich nur die Reinigung mittels eines Dauermagneten als tauglich, da es hierbei zu keiner Vergrößerung der Teilchendurchmesser kam. Reinigungsversuche mit Hilfe der Teilchengrößenseparation und der Gelfiltration führten zu einer vermehrten Aggregatbildung in der zu reinigenden Nanopartikelsuspension. Die Variation der Menge der Kopplungsreaktion zugegebenen Reaktionspartnern zeigte, dass eine eingegebene Menge von 0,1 mg Antikörpern pro Kopplungsansatz und 8 mg EDC, als Kopplungsreagenz, eine ideale Ausbeute der an die magnetischen Nanopartikel gebundenen Antikörpern zur Folge hat und keine Teilchenvergrößerung stattfindet. Ein Vergleich der tatsächlich an die Nanopartikel gebundenen Menge an Antikörpern mit verschiedenen Antikörperinkubationszeiten ergab eine bestmögliche Inkubationszeit von 180 Minuten.

---

## **7.1 Einfluss der Temperatur auf das Aggregationsverhalten von magnetischen Nanopartikeln**

### **7.1.1 Native magnetische Nanopartikel**

Durch die Erwärmung der nativen magnetischen Nanopartikel auf 40°C und 60°C war keine Vergrößerung der Partikel zu beobachten. Der Vergleich mit einer Kontrollprobe von nativen magnetischen Nanopartikeln zeigt, dass bei allen Versuchsansätzen der Kurvenverlauf (Volumenverteilung % / Teilchendurchmesser nm) nahezu identisch ist.

Die Reproduzierbarkeit der durchgeführten Versuche ist durch einen Wiederholungsversuch gegeben. Durch mehrmalige Messungen gelang es, zuverlässige Ergebnisse zu erhalten. Die STD der einzelnen Ergebnisse liegen so alle unter 0,5 %, dies zeigt, dass die Ergebnisse reproduzierbar und gut miteinander vergleichbar sind.

Eine Behandlung der nativen magnetischen Nanopartikel mit Temperaturen von 40°C und 60°C führte nicht zu einer Vergrößerung der Teilchendurchmesser. Die Eisenoxidkerne und die sie umgebenden Hüllmoleküle tolerieren also die eingesetzten Temperaturen. Trennt sich die Hüllschicht vom Kern der magnetischen Nanopartikel, bedingt dies Agglomerieren der Partikel und ein Ausfallen aus der Trägersuspension (Müller, persönliche Mitteilung 2004). Die zugeführte Wärme führte demnach nicht zu einem Ablösen der Hüllschicht vom magnetischen Kern der Nanopartikel, was folglich zu einem Ausfallen und Agglomerieren der magnetischen Nanopartikel geführt hätte.

Es ist also möglich, die verwendeten nativen magnetischen Nanopartikel im Rahmen von Hyperthermie – und Thermoablationsbehandlungen einzusetzen, ohne dass eine Agglomeratbildung zu erwarten ist.

### **7.1.2 Funktionalisierte magnetische Nanopartikel**

Die Behandlung von funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln mit Temperaturen von 40°C und 60°C führte zu einer Vergrößerung der Teilchendurchmesser.



---

Das erhaltene Datenmaterial konnte durch Wiederholungsversuche in seinem Inhalt bestätigt werden, und da die errechneten STD der einzelnen Ergebnisse sehr gering ( unter 0,1% des Mittelwertes) sind, können die gewonnenen Erkenntnisse als aussagekräftig verstanden werden. Betrachtet man die Messkurven (Volumenverteilung % / Teilchendurchmesser nm) der mit 40°C und 60°C behandelten funktionalisierten Nanopartikel, so erkennt man eine deutlich Zunahme der Teilchendurchmesser. Betrachtet man im Gegensatz dazu dasselbe Datenmaterial nach einer anderen Auswertungsform (Teilchen % / Teilchendurchmesser nm) so zeigt sich, dass schon eine geringe Teilchenanzahl an vergrößerten Teilchen deutlich als ein großer Volumenunterschied in Erscheinung treten kann. Durch die Einwirkung von Wärme haben sich also Agglomerate gebildet, die trotz ihrer geringen Anzahl schon eine deutliche Auswirkung zeigen.

Bei Einwirkung von 40 und 60°C zeigen native magnetische Nanopartikel keine Agglomerate. Deshalb kann man die Agglomeratbildung bei funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln auf die Anwesenheit von Antikörpern zurückführen, die an die Nanopartikel gebunden wurden. Ab einer Temperatur von über 45°C kommt es zu Denaturierung von Proteinen (Antikörpern) (Kreuzig, 1990, Löffler et Petriedes, 1998). Die denaturierten Antikörper gehen dann vermutlich Bindungen mit anderen Antikörperfragmenten, die an die Nanopartikel gebunden sind, ein (Shen T et al., 1993, Militello et al., 2004). Dadurch wird eine Kettenbildung zwischen Nanopartikeln und Antikörpern bzw. deren Fragmenten möglich (Vermeer et Norde, 2000). Aufgrund dieses Verhaltens ist es vorstellbar, dass auch bei den vorliegenden funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln, denaturierte Antikörperfragmente Ketten bilden, welche die Agglomerate bedingen.

Bezogen auf spätere Anwendungsmöglichkeiten lässt sich feststellen, dass z. B bei Hyperthermie - oder Thermoablationsbehandlungen mit funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln zu Agglomeraten kommen kann. Ob die vergrößerten Teilchendurchmesser die Gefahr von Embolien bergen, müssen *in vivo* Studien noch zeigen. Es muss dann allerdings noch geklärt werden, ob an ihrem Zielort im Körper gebundene Nanopartikel, selbst wenn sie während bzw. nach der entsprechenden Erwärmung agglomerieren, überhaupt in die Blutbahn gelangen.

---

## 7.2 Einfluss der Lyophilisierung auf die Größe nativer magnetischer Nanopartikel

Die Messung mit einem Laserdiffraktometer nach Lyophilisierung nativer magnetischer Nanopartikel ergab die Bildung sehr große Aggregate, verglichen mit nativen magnetischen Nanopartikeln, die nicht lyophilisiert wurden.

Die erhaltenen Daten konnten durch einen Wiederholungsversuch bestätigt werden. Betrachtet man die STD der beiden Volumenanteile, so zeigt sich, dass die STD in beiden Fällen sehr gering (unter 0,1% des Mittelwertes) ist. Die beiden Ergebnisse sind also aussagekräftig und können miteinander verglichen werden.

Die entstandenen Agglomerate bei den lyophilisierten magnetischen Nanopartikeln können dadurch erklärt werden, dass durch den entstandenen Wasserentzug bei diesem Verfahren, der hydrodynamische Schwebezustand der Nanopartikel gestört wird. Diese Störung des hydrodynamischen Schwebezustandes der Nanopartikel liegt vermutlich in ihren Hüllmolekülen begründet und kann durch die Verwendung von kryoprotektiven Zuckern als Hüllschicht vermieden werden (Heiati H et al., 1998). Hierbei werden die einzelnen magnetischen Nanopartikel auch dann an der Agglomeration gehindert, wenn sich durch den Wasserentzug oder Frosttemperaturen die einzelnen Teilchen eigentlich miteinander verbinden würden. Dadurch wird eine Lyophilisierung der Nanopartikel möglich, ohne dass es zu Agglomerationen kommt (Heiati H et al., 1998, Sommerfeld et al., 1997 et 2000).

So gelang es Heiati, so genannte *solid lipid nanoparticles (SLN)* erfolgreich zu lyophilisieren, nachdem Trehalose als kryoprotektiver Hüllzucker eingesetzt wurde (Heiati H et al., 1998). Da sich die von Heiati verwendeten Partikel (Lipidkern) stark von den hier verwendeten Nanopartikeln (Eisenoxidkern) unterscheiden, sollten die durchgeführten Versuche klären, ob es überhaupt zu Agglomerationen kommt.

Die starken Agglomerationen, die nach der Lyophilisation beobachtet werden, führen zu dem Schluss, dass dieses Verfahren für die Einengung und spätere Lagerung der hier verwendeten magnetischen Nanopartikel ungeeignet ist. Aber die von Heiati durchgeführten Untersuchungen deuten darauf hin, dass auch bei den hier verwendeten magnetischen Nanopartikeln, wenn entsprechende Modifikationen durch kryoprotektive Zucker vorgenommen werden, es möglich wird, diese zu lyophilisieren (Heiati H et al., 1998). Hierzu müssten von Herstellerseite aus die

---

magnetischen Nanopartikel mit einem anderen Hüllzucker versehen werden, ob dies realisierbar ist, gilt es noch zu überprüfen.

### **7.3 Lagerung nativer und funktionalisierter magnetischer Nanopartikel**

Nachdem native magnetische Nanopartikel für fünf Monate bei 4°C aufbewahrt wurden, zeigte sich, dass die nativen magnetischen Nanopartikel während diesem Zeitraum keine eindeutige Veränderung bezüglich ihrer Partikelgröße aufwiesen.

Die STD der ermittelten Daten waren alle sehr gering (unter 0,1% des Mittelwertes) und durch Wiederholungsversuche konnte die Reproduzierbarkeit aufgezeigt werden. Daraus kann man schließen, dass die hier diskutierten Ergebnisse zuverlässig sind.

Die Stabilität der verwendeten magnetischen Nanopartikel über den Zeitraum von fünf Monaten, ist auf den sauren pH-Wert (pH 4,95) der Suspension zurückzuführen. Durch den sauren pH-Wert wird die Hüllschicht der Nanopartikel beständig gehalten und so der hydrodynamische Schwebezustand der Nanopartikel nicht gestört (Sommerfeld et al., 1997 et 2000). In einer vergleichbaren Arbeit hat Sommerfeld et al. magnetische Nanopartikel mit verschiedenen Hüllmolekülen versehen und in unterschiedlichen Suspensionsmedien aufbewahrt. Die Lagerzeit erstreckte sich von zwei Monaten bis zu einem Jahr. Die nachfolgenden Messungen ergaben, dass dextranumhüllte Nanopartikel in sauren Suspensionen am haltbarsten waren. Andere Suspensionsmedien und Hüllmoleküle führten zu Agglomerationen (Sommerfeld P et. al., 1997, 2000,). Dies konnten die hier ermittelten Ergebnisse auch für die hier verwendeten magnetischen Nanopartikel bestätigen.

Im Gegensatz dazu zeigten funktionalisierte magnetische Nanopartikel allerdings nach fünf Monaten eine Vergrößerung der Teilchendurchmesser.

Das erhaltene Datenmaterial wurde durch Wiederholungsversuche in seinem Inhalt bestätigt. Die gemessenen Daten wiesen alle eine STD von weniger als 0,1% des Mittelwertes auf und können so als vertrauenswürdig erachtet werden.

Nach einer fünfmonatigen Lagerung haben sich die Teilchendurchmesser der funktionalisierten magnetischen Nanopartikel vergrößert. Da eine Vergrößerung der Teilchendurchmesser nur bei funktionalisierten Nanopartikeln und nicht bei nativen

---

Partikeln auftritt, ist die Ursache der Agglomeration bei dem verwendeten Liganden zu suchen. Bei einer Lagerung über den hier angewandten Zeitraum als Suspension, d.h. in feuchtem Zustand, denaturieren die Antikörper und bilden Fragmente (Löffler et Petriedes, 1998). Diese Antikörperfragmente verbinden sich wahrscheinlich mit gebundenen Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten, was zu einer Agglomeratbildung führt (Breen et al., 2001). Dieses Verhalten vorausgesetzt, lassen sich auch die bei den hier verwendeten funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln entstandenen Agglomerate erklären. Eine Kettenbildung der entstandenen Antikörperfragmente ist während der Lagerzeit von fünf Monaten somit durchaus denkbar.

Es ist möglich, native magnetische Nanopartikel ohne Schaden über einen längeren Zeitraum aufzubewahren, ohne auf weniger geeignete Methoden wie Einfrieren und Lyophilisation zugreifen zu müssen. Bei funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln führt der Zerfall, und damit verbundene Agglomeration des Liganden, zu vergrößerten Teilchen. Eine Lagerung von funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln ist deshalb nicht anzuraten.

Als Folge davon sollten funktionalisierte Nanopartikel zügig nach der Funktionalisierung eingesetzt werden, um einer Agglomeratbildung der Teilchen zuvor zu kommen.

#### **7.4 Tauglichkeit verschiedener Verfahren zur Abtrennung ungebundener Antikörper**

Nach der Gelfiltration eines Kopplungsansatzes von magnetischen Nanopartikeln nach der Funktionalisierung mit einem Antikörper zeigten nachfolgende Messungen, dass es zu sehr großen Agglomeraten kommt (Teilchendurchmesser bis zu 17180 nm).

Das erhaltene Datenmaterial zeigte seine Reproduzierbarkeit in einem Wiederholungsversuch und die STD sind durchweg sehr gering (unter 3% des Mittelwertes), was für zuverlässiges Datenmaterial spricht.

Diese großen Teilchendurchmesser in der gelfiltrierten Nanopartikelsuspension sind in sofern überraschend, als dass bei anderen Studien (siehe unten) durchaus native und funktionalisierte magnetische Nanopartikel mit dem Verfahren der Gelfiltration

---

von unerwünschten Bestandteilen gereinigt wurden, ohne dass eine vermehrte Agglomeration beschrieben wurde.

Die Dextranhülle der hier verwendeten magnetischen Nanopartikel kann nicht als Ursache der auftretenden Agglomerate angesehen werden, da solche dextranumhüllte Partikel bereits vielfach von anderen Autoren mit Hilfe der Gelfiltration gereinigt wurden. So beschreibt Zhao et al. (2002) eine Reinigung der von ihm mit Peptiden gekoppelten CLIO (cross-linked superparamagnetic iron oxid) mittels Gelfiltration. In einer weiteren Arbeit, in der MION (Monocrystalline iron oxid nanoparticles) verwendet werden, beschreibt Remsen et al. (1996) die Verwendung der Gelfiltration. Bei Kresse et al. (1998) werden unerwünschte Reaktionsprodukte aus einer Suspension aus USPIOs (ultrasmall superparamagnetic iron oxid) mittels Gelfiltration entfernt. Eine Suspension aus LCDIO (lon-circulating dextran-coated iron oxid nanoparticles) wird von Moore et al. (2000) mittels Gelfiltration gereinigt. In all diesen Arbeiten sind die verwendeten Nanopartikel, wie auch in dieser Arbeit, mit einem Dextran umhüllt.

In den vorgenannten Studien wird, im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, ein Puffer bei der Gelfiltration verwendet, dessen pH-Wert leicht im Basischen liegt [Zhao et al., (2002), Högemann et al., (2002), Remsen et al., (1996), Kresse et al., (1998), Moore et al., (2000)]. Aber auch der von den anderen Arbeiten abweichende pH-Wert ist nicht für die Agglomeratbildung verantwortlich, da aufgrund der Anweisung des Herstellers der hier verwendeten funktionalisierten Partikel, (Kautz, persönliche Mitteilung) bei der Gelfiltration ein pH-Wert von 4,95 verwendet wurde. Auch die Funktionalisierungsreaktion der magnetischen Nanopartikel (native Nanopartikel werden mit pH-Wert 4,95 geliefert) verläuft im sauren Milieu, und hierbei sind ebenfalls keine Agglomerate zu beobachten (siehe funktionalisierte magnetische Nanopartikel, die mit einem Dauermagneten gereinigt wurden. Am wahrscheinlichsten ist hier, dass die von uns verwendeten magnetischen Nanopartikel, sei es aufgrund ihrer Größe oder herstellungsbedingter Struktur, dazu neigen, bei hohen Verdünnungen aus der Suspension auszufallen und zu agglomerieren. Als Grund dafür kommt eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes in Frage (Zimmermann et Muller, 2001, Freitas et Muller, 1999). Wie die Veränderung des Elektrolytgehaltes ein Ausfallen der Nanopartikel und die daraus folgenden Agglomerationen bedingt, ist unklar (Müller, persönliche Mitteilung 2004). Aber nicht nur die Nanopartikel können bei starker Verdünnung und der damit

---

verbundenen Verschiebung des isoelektrischen Punktes agglomerieren, auch die in der Suspension enthaltenen Antikörper können hierbei Agglomerate bilden (Militello et al., 2004). Dies zeigt aber, dass Reinigungsverfahren, im Speziellen hier die Gelfiltration, welche die zu reinigende Suspension stark verdünnt, nicht geeignet ist die hier verwendeten magnetischen Nanopartikel von unerwünschten Bestandteilen zu trennen.

Auch die funktionalisierten magnetischen Nanopartikel, die mit Hilfe der magnetischen Teilchengrößenseparation gereinigt wurden, zeigten eine starke Agglomeratbildung. So fanden sich Teilchendurchmesser von einer Größe bis zu 57  $\mu\text{m}$ .

Die errechneten STD liegen alle unter 0,01% des Mittelwertes und sind somit zu vernachlässigen. Auch durchgeführte Wiederholungsversuche, die alle zu einem übereinstimmenden Ergebnis gelangten, lassen den Schluss zu, dass das hier verwendete Datenmaterial als zuverlässig angesehen werden kann.

Das verwendete Magnetfeld von 50 mT kann nicht als Ursache der Agglomeratbildung herangezogen werden. Auch bei der Reinigung mit einem Dauermagneten (siehe unten) wirkt ein vergleichbar starkes Magnetfeld auf die funktionalisierten magnetischen Nanopartikel ein. Hier ist die Tatsache, dass die magnetischen Nanopartikel mit einem Antikörper gekoppelt sind, maßgeblich für die Agglomeratbildung verantwortlich. Denn eine Größenauftrennung von nach demselben Verfahren hergestellten nativen magnetischen Nanopartikeln kann ohne Agglomeratbildung mit der Teilchengrößenseparation durchgeführt werden (Kießling, 2003). So ist es vorstellbar, dass wenn Antikörper an die Partikel gekoppelt sind, diese Komplexe eine Größe erreichen, die sich in den Magnetperlen der Trennsäule (siehe Methodenteil) verkeilen. Der dann während des Arbeitsvorgangs ausgeübte Druck und das durch die Perlen verstärkte Magnetfeld führen vermutlich dazu, dass die einzelnen Nanopartikel/Antikörperkomplexe aneinander haften bleiben und so diese großen Agglomerate bilden. Da auch bei diesem Verfahren eine starke Verdünnung der zu reinigenden Suspension nötig ist, trifft auch hier die oben genannte Verschiebung des isoelektrischen Punktes und die damit verbundene Agglomeratbildung zu. So zeigt sich, dass auch dieses Verfahren nicht zur Abtrennung überschüssiger Antikörper bei den verwendeten magnetischen Nanopartikeln geeignet ist.

---

Die nach einer Abtrennung der freien Antikörper mittels eines Dauermagneten ermittelten Teilchendurchmesser der funktionalisierten magnetischen Nanopartikel sind kaum höher als die der gemessenen Referenzprobe aus nativen magnetischen Nanopartikeln. Dies zeigt, dass diese Methode bei den verwendeten magnetischen Nanopartikeln während der Reinigung von freien Antikörpern nicht zu Agglomeraten führt.

Ein Wiederholungsversuch konnte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zeigen und die STD der einzelnen Ergebnisse sind sehr gering (unter 0,1% des Mittelwertes), so dass die verwendeten Daten als aussagekräftig angesehen werden können.

Das Verfahren der Dauermagnettrennung ist sehr schonend. Als Vorteil der Reinigung mit einem Dauermagneten ist die Möglichkeit der Aufkonzentration von Suspensionen zu nennen. Im Vergleich zu der oben genannten Teilchengrößenseparation werden hier zwar die magnetischen Nanopartikel ebenfalls in enge räumliche Nähe versetzt, aber kein Druck ausgeübt. Auch findet keine solche Verdünnung statt, die eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes verursachen würde. Funktionalisierte siliziumumhüllte magnetische Nanopartikel konnten gereinigt werden, ohne dass eine Vergrößerung der Teilchendurchmesser zu beobachten ist (Xin Gao et al., 2003). Ebenfalls mit Hilfe eines Magneten und mehrerer Waschschriffe reinigen Khalafalla und Reimers (1980) eine Suspension magnetischer Nanopartikel von unerwünschten Bestandteilen der Suspension. Mit *ethanolamine* bzw. *aminopropyltrimethoxysilane* umhüllte funktionalisierte Nanopartikel konnten von nicht-gebundenen Proteinen mit diesem Verfahren gereinigt werden (Wang FH et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass auch die hier verwendeten dextranumhüllten magnetischen Nanopartikel mit Hilfe der Dauermagnettrennung erfolgreich und ohne Vergrößerung der Teilchendurchmesser gereinigt werden können.

Die Verfahren der Gelfiltration und Teilchengrößenseparation führen zu einer sehr starken Verdünnung der Proben. So ist es, da kein geeignetes Verfahren zur erneuten Einengung der Proben zur Verfügung steht, nötig, die Methode der Dauermagnettrennung zu verwenden. Die Untersuchungen zeigten, dass eine Abtrennung von ungebundenen Antikörpern mit Hilfe der Gelfiltration und Teilchengrößenseparation zu starker Agglomeratbildung führt. Einzig durch die Reinigung mittels eines Dauermagneten konnten Aggregate vermieden werden.

---

## **7.5 Einfluss verschiedener Antikörperkonzentrationen auf funktionalisierte magnetische Nanopartikel**

Es kann festgestellt werden, dass durch der Funktionalisierungsreaktion zugeführte Antikörperkonzentrationen von 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml und 2,0 mg/ml, keine Agglomeratbildung der funktionalisierten magnetischen Nanopartikel zu beobachten ist. Anders sieht dieses bei einer Antikörperkonzentration von 10,0 mg/ml aus, hier sind große Agglomerate zu verzeichnen.

Die STD der hier erfassten Daten sind sehr gering (unter 5% des Mittelwertes) und die durchgeführten Wiederholungsversuche zeigten die Reproduzierbarkeit der ermittelten Ergebnisse, deshalb kann von der Zuverlässigkeit des hier vorliegenden Datenmaterials ausgegangen werden.

Die verwendete Antikörpermenge von 1,0 mg/ml ist die als Standardmenge festgelegte Menge in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen. In den bereits beschriebenen Experimenten wurden solche Ansätze mit nativen magnetischen Nanopartikeln verglichen und keine Agglomeratbildung festgestellt. So kann hier gesagt werden, dass bei den Messkurven der oben angeführten Antikörpermengen (0,5 mg/ml und 2,0 mg/ml), da sie deckungsgleich mit der Messkurve von 1,0 mg/ml verlaufen, keine Agglomeratbildung vorzufinden ist. Eine Variation der zugegebenen Antikörpermengen im Rahmen der obigen Mengen ist somit ohne Einschränkung möglich.

Dagegen führte die Zugabe von 10,0 mg/ml Antikörper zur Bildung von Teilchen mit sehr großem Durchmesser. Die Messungen zeigten Teilchen bis zu einer Größe von 92  $\mu\text{m}$ . Diese sehr großen Teilchen lassen sich durch Quervernetzungen der Antikörper untereinander erklären. Während der Funktionalisierungsreaktion werden durch das Kopplungsreagenz die Bindungsstellen der Antikörper aktiviert. Durch den starken Überschuss an Antikörpern ist es möglich, dass es nun zu Bindungen zwischen den Antikörpern kommt und so Antikörperketten gebildet werden. Verstärkt durch hohe Konzentration der Antikörper, sind Van der Waals Kräfte wirkende als Ursache der Aggregatbildung ebenfalls denkbar (Tedder JM, 1972). Ausgehend von den gemachten Beobachtungen sollte man, um Aggregate zu vermeiden, davon absehen, Kopplungsreaktionen mit einem solchen Überschuss an Antikörpern durchzuführen.



---

Nach der Inkubation der magnetischen Nanopartikel mit Antikörperkonzentrationen von 0,5 bis 10 mg/ml, ergab sich nur bei 10 mg/ml eine erhöhte Menge an gebundenen Antikörpern. Die Messungen wurden zur höheren Genauigkeit pro Versuchsansatz dreimal durchgeführt und zur Bestätigung der erhaltenen Ergebnisse dreimal wiederholt. Deshalb sind die erhaltenen Ergebnisse aussagekräftig und nicht auf methodische Ungenauigkeiten zurückzuführen. Jedoch sind die ermittelten Proteinkonzentrationen nur Schätzwerte, da die untersuchten Kopplungsansätze umso inhomogener werden, je größer die darin enthaltenen Teilchen (Agglomerate) sind. Trotz dieses Nachteils war diese Methode, auch aus Ermangelung einer Alternative, ausreichend für die hier durchgeführten Untersuchungen.

Es zeigten sich, dass zwar bei einer Halbierung der zugegebenen Proteinmenge (bezogen auf eine Antikörper-Ausgangskonzentration von 1,0 mg/ml) auch ungefähr eine Halbierung der gebundenen Proteinmenge erfolgt, aber eine Verdoppelung der Ausgangsmenge an Antikörpern keineswegs zu einer Verdoppelung, oder gar einer deutlichen Erhöhung der tatsächlich gebundenen Proteinmenge führt. Es ist also nicht möglich, mit einer Erhöhung der Ausgangsmenge an Antikörpern bis 2,0 mg/ml eine erhöht Ausbeute an gebundenen Antikörpern zu erreichen. Es ist vorstellbar, dass bereits bei einer Ausgangsmenge von 1,0 mg/ml an Antikörpern eine Sättigung der Antikörper-Bindungsstellen an den magnetischen Nanopartikel erreicht wird.

Eine mit einer Antikörperkonzentration von 10 mg/ml durchgeführte Kopplungsreaktion ergab eine höhere Menge an Antikörpern, als bei einer Funktionalisierung der Nanopartikel mit einer Antikörperkonzentration von 1,0 mg/ml in der funktionalisierten und gereinigten Suspension. Aber mit Verweis auf bezüglich dem Aggregationsverhalten angeführte Aspekte, besteht die Möglichkeit, dass sich die Antikörper gar nicht mit den magnetischen Nanopartikeln verbunden haben, sondern ein Geflecht aus Quervernetzungen und Agglomeraten bilden (Militello et al., 2004) und so fälschlicherweise eine vermehrte Antikörperbindung festgestellt wird. Doch selbst wenn sich die Antikörper, wie gewollt, an die Partikel kovalent gebunden haben, ist diese Bindung im Vergleich mit der eingesetzten Antikörpermenge eher gering. Denn bei einer eingesetzten zehnfachen Menge, im Bezug auf 1,0 mg/ml, wurde eine deutlich höhere Ausbeute an gebundenen Antikörpern in der gereinigten Suspension erwartet. So aber stellte sich die Kopplungsreaktion mit einer Antikörpermenge von 10 mg/ml nicht als effektiv heraus.

---

Eine verwendete Antikörpermenge von 1,0 mg/ml ist die ideale Menge, mit der eine Sättigung der einzelnen magnetischen Nanopartikel erreicht wird, ohne dass es zu einer Agglomeratbildung kommt. Zukünftige Ansätze zur Kopplung von Antikörpern an magnetische Nanopartikel sollten demnach mit dieser Menge an Antikörpern durchgeführt werden. Weitere Studien müssen zeigen, ob sich diese Ergebnisse auch für andere Nanopartikel, Hüllmoleküle und Liganden als gültig erweisen.

## **7.6 Einfluss der Menge an Kopplungsreagenz auf die Funktionalisierung magnetischer Nanopartikel mit Antikörpern**

Eine Kopplungsreaktion zwischen magnetischen Nanopartikeln und einem Antikörper, die mit einer Menge an Kopplungsreagenz (EDC) von 16 mg durchgeführt wurde, ergab deutlich größere Teilchendurchmesser als dieselbe Kopplungsreaktion, die nur mit 8 mg EDC durchgeführt wurde.

Eine Reproduzierbarkeit des Datenmaterials wurde durch einen Wiederholungsversuch gewährleistet und die errechneten STD der erhaltenen Daten sind so gering (unter 5% der Mittelwerte), dass das verwendete Datenmaterial als aussagekräftig zu verstehen ist.

In Abhängigkeit der verwendeten Menge an EDC ergaben sich unterschiedliche Teilchendurchmesser. So waren im Ansatz mit 8 mg EDC keine vergrößerten Teilchen im Vergleich zu nativen magnetischen Nanopartikeln zu finden. Im Gegensatz dazu kam es bei 16 mg EDC zu einer sehr starken Agglomeratbildung. Diese Agglomeratbildung kann wie folgt erklärt werden. Durch eine vermehrte Zugabe des sauren Kopplungsreagenzes wird der pH-Wert der Suspension unter einen Punkt gesenkt, an dem die verwendeten Antikörper denaturieren (Löffler et Petriedes, 1998) um dann zu agglomerieren (Militello et al., 2004). Da das Kopplungsreagenz aufgrund der darin enthaltenen Salze durchaus als Elektrolyt angesehen werden kann, ist auch der Umstand zu berücksichtigen, dass der isoelektrische Punkt in der Suspension soweit verschoben worden ist (Zimmermann et Muller, 2001, Freitas et Muller, 1999), dass die magnetischen Nanopartikel selbst ausfallen und sich zu Agglomeraten zusammen fügen (Müller, persönliche Mitteilung 2004). Aufgrund der großen Agglomeratbildung ist eine Erhöhung der Menge an Kopplungsreagenz nicht vorteilhaft.

---

Ein Vergleich der tatsächlich gebundenen Proteinmengen dieser beiden Versuchsansätze (8 mg und 16 mg EDC) konnte keinen Vorteil aufzeigen, wenn 16 mg Kopplungsreagenz verwendet wird.

Zur höheren Genauigkeit wurden die Messungen dreimal durchgeführt und zur Bestätigung der erhaltenen Ergebnisse dreimal wiederholt. So konnte die Aussagekraft der erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Aufgrund der Inhomogenität der Kopplungsansätze, die umso höher ist, je größer die darin enthaltenen Teilchendurchmesser sind, sind die ermittelten Proteinkonzentrationen nur Schätzwerte. Aus Ermangelung einer Alternative war diese Methode ausreichend für die hier durchgeführten Untersuchungen.

So war die gemessene Proteinmenge des mit 8 mg EDC durchgeführten Kopplungsansatzes nicht ausschlaggebend geringer, als die der Kopplungsreaktion, welcher 16 mg EDC beigegeben wurde. Es ergibt sich der Schluss, dass trotz einer Verdoppelung des Kopplungsreagenzes nicht proportional mehr Protein an die magnetischen Nanopartikel gebunden wird. Eine Erklärung hierfür ist der Umstand, dass das Kopplungsreagenz dazu dient, die reaktiven Gruppen der Hüllmoleküle der magnetischen Nanopartikel zu aktivieren, aber an jedem Nanopartikel nur eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen vorhanden ist. Die erhöhte Menge Protein, die in dem fertigen Kopplungsansatz gefunden wird, ist vermutlich auf eine Quervernetzung der Antikörper zurückzuführen (Löffler et Petriedes, 1998). Wie oben schon erwähnt, kann die Denaturierung der Antikörper dazu führen, dass Antikörperfragmente untereinander Bindungen eingehen. So liegt die Vermutung nahe, dass die größere Anzahl an ermittelten Proteinmolekülen darin begründet liegt, dass diese nicht nur direkt an die magnetischen Nanopartikel gebunden sind, sondern Verbindungsglieder zwischen den Nanopartikeln und anderen Antikörperfragmenten bilden (Militello et al., 2004).

Abschließend kann festgestellt werden, dass aufgrund der großen Teilchendurchmesser eine vermehrte Zugabe des Kopplungsreagenz zur Kopplungsreaktion nicht sinnvoll ist. Also auch hinsichtlich der Ausbeute an gebundenen Proteinen führt die Erhöhung des Kopplungsreagenzes nicht zu einem zufrieden stellenden Ergebnis.

---

## 7.7 Die Protein-Bindungskapazität magnetischer Nanopartikel in Abhängigkeit von der Antikörperinkubationszeit

Eine Variation der Inkubationszeiten des zu bindenden Antikörpers bei der Funktionalisierungsreaktion von magnetischen Nanopartikeln ergab, dass mit zunehmender Dauer der Inkubationszeit auch die Menge an gekoppelten Antikörpern ansteigt.

Die Ergebnisse stützen sich auf jeweils drei Versuchsansätze pro Inkubationszeit und bei jedem Versuchsansatz konnten vergleichbare Daten erzielt werden. Zwar ist ab einer Inkubationszeit von 90 Minuten eine Vergrößerung der Standardabweichung von  $\pm 1 \mu\text{g}/100\mu\text{l}$  und kleiner, auf bis zu  $\pm 7\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ , zu beobachten, aber dennoch weist eine Tendenz eindeutig zu ansteigenden Mengen an gebundenem Protein und die gewonnenen Ergebnisse können als aussagekräftig angesehen werden.

Man erkennt, dass erst ab einer Inkubationszeit der magnetischen Nanopartikel mit dem verwendeten Antikörper von 120 Minuten und höher vermehrt Antikörper an die magnetischen Nanopartikel gebunden werden. Warum gerade ab diesem Zeitpunkt ein Anstieg der gebundenen Proteinmengen zu beobachten ist, bleibt unklar. Aber er zeigt deutlich, dass um eine optimale Ausbeute an gekoppeltem Protein zu erhalten, die Antikörperinkubationszeit keinesfalls unter 180 Minuten gewählt werden sollte.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit zeigen, dass eine Temperatureinwirkung bis  $60^\circ\text{C}$  keine Auswirkung auf die Teilchengröße nativer magnetischer Nanopartikel hat. Eine Agglomeratbildung ist im Rahmen von Hyperthermie – und Thermoablationsbehandlungen nicht zu erwarten. Allerdings zeigte sich, dass funktionalisierte magnetische Nanopartikel, nachdem sie denselben Temperaturen ausgesetzt waren, vergrößerte Teilchendurchmesser ausbilden. Diese vergrößerten Teilchen sind vornehmlich auf Denaturierungsprozesse und Agglomerationen der verwendeten Antikörper zurückzuführen. In diesem Fall sollten weitere Studien klären, ob dies auch *in vivo* geschieht und wenn ja, ob dann bei einem späteren Patienteneinsatz der Nanopartikel die Gefahr von Embolie besteht.

Das Verfahren der Lyophilisation erwies sich als nicht durchführbar, da die verwendeten magnetischen Nanopartikel nach der Gefriertrocknung sehr große Teilchendurchmesser zeigten. Dieser Umstand konnte dadurch erklärt werden, dass

---

während dieses Verfahrens, durch den damit verbundenen Wasserentzug und die tiefen Temperaturen, der hydrodynamische Schwebezustand der Nanopartikel maßgeblich gestört wird und es so zu Agglomeraten kommt. Aufgrund dieser Tatsache ist es nicht möglich, die verwendeten magnetischen Nanopartikel zu Lagerungszwecken oder zur Aufkonzentrierung zu lyophilisieren. Eine Lösung dieses Problems ist wenn herstellerseitig eine Ummantelung der magnetischen Nanopartikel mit kryoprotektiven Zuckern erfolgen würde.

Die Überprüfung verschiedener Reinigungsverfahren zur Abtrennung von nicht gebundenen Antikörpern aus der funktionalisierten Nanopartikelsuspension ergab, dass die Reinigung mittels Gelfiltration und Teilchengrößenseparation, aufgrund der starken Verdünnung und der damit einhergehenden Veränderung des isoelektrischen Punktes der Suspension und zusätzlich wegen dem stark wirkenden Magnetfeld der Teilchengrößenseparation, zum Ausfallen und Agglomerieren der funktionalisierten magnetischen Nanopartikel führt. Der erfolgreich beschriebene Einsatz der Gelfiltration in der Literatur lässt auch hier den Einsatz anderer Hüllmoleküle als notwendig erscheinen. Einzig das Verfahren der Waschung mit Hilfe eines Dauermagneten zeigte sich als anwendbar. Hier war keine Vergrößerung der Teilchendurchmesser zu beobachten.

Eine Variation der in die Kopplungsreaktion eingegebenen Antikörpermenge konnte zeigen, dass eine Antikörpermenge von 1,0 mg/ml die ideale Menge zur Durchführung der Funktionalisierungsreaktion darstellt. Eine Verdoppelung dieser Menge ergab keine Erhöhung der gebundenen Antikörper. Es ist davon auszugehen, dass bei einer Antikörpermenge von 1,0 mg/ml die Bindungsstellen der zugegebenen magnetischen Nanopartikel gesättigt sind. Ferner zeigte sich, dass eine Verzehnfachung dieser Antikörpermenge zu starken Agglomeraten führt. Dies ließ sich durch einwirkende Van-der-Waals-Kräfte erklären. Diese Untersuchungen konnten aufzeigen, dass zukünftig mit einer Antikörpermenge von 1,0 mg/ml am effektivsten die Funktionalisierungsreaktion durchzuführen ist.

Um die Kopplungsreaktion zwischen magnetischen Nanopartikeln und Antikörpern weiter zu optimieren, wurde untersucht, ob sich eine Erhöhung des eingesetzten Kopplungsreagenzes (EDC) positiv auf die Ausbeute der an die magnetischen Nanopartikel gebundenen Antikörper auswirkt. Es konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Zugabe von EDC nicht zu einer erhöhten Anbindung von Antikörpern an

---

die magnetischen Nanopartikel führt. Allerdings kam es zu großen Agglomeraten, die durch Denaturierungsvorgänge der Antikörper und dem Ausfallen der magnetischen Nanopartikel aus der Suspension zu erklären sind. Um eine Vergrößerung der Teilchendurchmesser zu vermeiden und eine ideale Ausbeute an gebundenen Antikörpern zu erreichen, ist eine EDC-Menge von 8 mg pro Kopplungsansatz zu verwenden.

In dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Antikörperinkubationszeit von 180 Minuten nicht unterschritten werden darf, wenn keine Einbussen bezüglich der an die magnetischen Nanopartikel gebundenen Antikörper hingenommen werden sollen.

Die hier untersuchten magnetischen Nanopartikel erwiesen sich als durchaus tauglich für eine weitere Anwendung in Diagnostik und Therapie. Jedoch sollten, um einen reibungslosen Einsatz zu gewährleisten, die in *vitro* gewonnen Erkenntnisse durch in *vivo* Studien untermauert werden.

---

## 8 Schlussfolgerungen der Arbeit

Mit der vorliegenden Arbeit konnten folgende Aspekte geklärt werden:

1. Die Inkubation nativer magnetischer Nanopartikel mit Temperaturen von 40 und 60°C führte zu keiner Änderung der Teilchendurchmesser. Im Gegensatz dazu führten dieselben Temperaturen durch Denaturierung und Kettenbildung der gebundenen Antikörper bei funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln zu Agglomeraten.
2. Eine Lyophilisierung nativer magnetischer Nanopartikel ergab große Agglomerate bei den gefriergetrockneten Nanopartikeln. Dieser Umstand erklärt sich durch die mit dem Wasserentzug verbundene Störung des hydrodynamischen Schwebezustands der Nanopartikel.
3. Eine Suspension nativer magnetischer Nanopartikel blieb bei einer Lagerung von fünf Monaten stabil. Im Gegensatz dazu bildeten sich während des gleichen Zeitraumes in einer Suspension funktionalisierter magnetischer Nanopartikel Agglomerate. Diese waren durch den Zerfall des gebundenen Antikörpers und der daraus resultierenden Kettenbildung zwischen den entstandenen Fragmenten zu erklären.
4. Von den drei zur Reinigung von Suspensionen funktionalisierter Nanopartikel eingesetzten Verfahren: Gelfiltration, Teilchengrößenseparation und Waschung mittels Dauermagneten, erwies sich einzig die Waschung mittels Dauermagneten als brauchbar. Aufgrund der starken Verdünnung bei den beiden anderen Verfahren und des stark wirkenden Magnetfeldes bei der Teilchengrößenseparation, kommt es zu großen Agglomeraten in der zu reinigenden Suspension.
5. Eine Erhöhung der zugegebenen Menge an Antikörpern bei der Funktionalisierungsreaktion ergab, dass nur eine Antikörperkonzentration von 1,0 mg/ml zu einer optimalen Anbindung der Antikörper an die magnetischen Nanopartikel führt. Es ist davon auszugehen, dass bei einer Antikörpermenge

---

von 1,0 mg/ml die Bindungsstellen der zugegebenen magnetischen Nanopartikel gesättigt sind. Eine weit höhere Antikörperkonzentration von 10,0 mg/ml führte zu keiner deutlichen Erhöhung der gebundenen Antikörpermenge, führte aber zu sehr großen Agglomeraten, was auf die Anwesenheit des Kopplungsreagenzes und durch die hohe Konzentration verstärkte Van-der-Waals-Kräfte zurückzuführen war.

6. Eine vermehrte Zugabe an Kopplungsreagenz (EDC) führte zu keiner vermehrten Anbindung von Antikörpern an die magnetischen Nanopartikel. Allerdings waren sehr große Agglomerate zu beobachten, was auf Denaturierungsvorgänge der Antikörper und dem Ausfallen der magnetischen Nanopartikel aus der Suspension zurückzuführen ist. Die ideale Menge des verwendeten Kopplungsreagenzes ist demnach 8 mg pro Kopplungsansatz.
7. Es konnte gezeigt werden, dass die ideale Inkubationszeit der Antikörper während der Funktionalisierungsreaktion mit 180 Minuten zu wählen ist. Bei einer kürzeren Inkubationszeit werden weniger Antikörper an die magnetischen Nanopartikel gebunden



---

## 8 Literaturverzeichnis

**Alexiou Ch, Arnold W, Hulin P, Klein R, Schmidt A, Bergemann Ch and Parak FG** (2001) Therapeutic efficacy of ferrofluid bound anticancer agent. *Magnetohydrodynamics* **37(3)**: 318-322

**Ardenne M von:** Systemische Krebs – Mehrschnitt – Therapie. *Hippokrates Verlag, Stuttgart* (1997).

**Berger P, Adelman NB, Beckman KJ, Campell DJ, Ellis AB and Lisensky GC** (1999) Preparation and properties of an aqueous ferrofluid. *J Chem Educ* **76**: 943-948

**Berkovski B, Bashtovoy V** Magnetic Fluids and Applications Handbook. *Begell House, New York* (1996).

**Blackmore RP** (1975) Micro-electromagnets for control of magnetotactic bacteria. *Science* **190**: 377-389

**Breen ED, Curley JG, Overcashier DE, Hsu CC, Shire SJ** (2001) Effect of moisture on the stability of a lyophilized humanized monoclonal antibody formulation. *Pharm Res.* **18(9)**:1345-53

**Bulte JWM, Brooks RA** (1997) Magnetic nanoparticles as contrast agents for MR imaging: an overview. *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*: 527 - 543

**Bradford MM** (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principles of Protein-Dye Binding, *Analyt. Biochem.* **72**: 248 - 254

**Domingo JC, Mercadal M, Petriz J and De Madariaga MA** (2001) Preparation of PEG-grafted immunomagnetoliposomes entrapping citrate stabilized magnetite particles and their application in CD34+ cell sorting. *J Microencapsul* **18**: 41-54

---

**Essig D, Oschmann R:** Lyophilisation. *Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart* (1993).

**Freitas C, Muller RH** (1999) Stability determination of solid lipid nanoparticles (SLN) in aqueous dispersion after addition of electrolyte. *J Microencapsul* **16(1)**:59-71

**Frühauf K** (2002) Evaluierung von temperaturrelevanten Parametern zur lokalen Erwärmung von Geweben mittels magnetischer Thermoablation. *Dissertation* Fridrich-Schiller-Universität Jena.

**Gao X, Kerry Yu KM, Tamb KY, Tsang SC** (2003) Colloidal stable silica encapsulated nano-magnetic composite as a novel bio-catalyst carrier. *CHEM. COMMUN*: 2998–2999

**Gesundheitsinformationsnetz** (2005), Magnetresonanztomographie: Funktionsweise und Aussagekraft. Web-Seite vom 05.01.2005, Einsehbar in <http://gin.uibk.ac.at/thema/magnetresonanztomographiewicke/>, Besucht am 05.01.2005

**Gordon RT, Hines JR, Gordon D** (1979) Intracellular hyperthermia: A biophysical approach to cancer treatment via intracellular temperature and biophysical alteration. *Med Hypotheses* **5**: 83-102

**Groß C, Büscher K, Romanus, Helm CA and Weitschies W** (2002) Characterization of a Ferrofluid by Atomic Force Microscopy and Photon Correlation Spectroscopy after Magnetic Fractionation *European Cells and Materials* **3**: 163-166

**Heiati H, Tawashi R, Phillips NC** (1998) Drug retention and stability of solid lipid nanoparticles containing azidothymidine palmitate after autoclaving, storage and lyophilization. *Journal of Microencapsulation* **15 (2)**: 173-184

**Hilger I, Andrä W, Hergt R, Hiergeist, Kaiser WA** (2000) Behandlung von Mammakarzinomen mittels magnetischer Thermoablation: In-vivo-Experimente an tumortragenden Mäusen

---

**Högemann D, Ntziachristos V, Josephson L and Weissleder R** (2002) High Throughput Magnetic Resonance Imaging for Evaluating Target Nanoparticle Probes. *Bioconjugate Chem* **13**: 116-121

**Jordan A** (1999) Nanotechnologie – ein neues Konzept für Diagnostik und Therapie maligner Tumoren. *Der Onkologe* **7**: 1073 - 1081

**Kang HW, Josephson L, Petrovsky A, Weissleder R and Bogdanov, jr. A** (2002) Magnetic Resonance Imaging of Inducible E-Selectin Expression in Human Endothelial Cell Culture. *Bioconjugate Chem.* **13**: 122-127

**Kautz** (2004) Persönliche Mitteilung. *INNOVENT e.V.*, Technologieentwicklung Prüssingstraße 27 B, D- 07745 Jena

**Khalafalla SE and Reimers GH** (1980) Preparation of dilution-stable magnetic fluids. *IEEE Trans. Magn* **16**: 178-183.

**Kießling A** (2003) Bindungsfähigkeit und Wärmeausbeute von magnetischen Nanopartikeln an Endothelzellen in Kultur. *Dissertation* Fridrich-Schiller-Universität Jena.

**Kresse M, Wagner S, Pfefferer D, Lawaczeck R, Elste V and Semmler W** (1998) Targeting of Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide (USPIO) Particles to Tumor Cells *In Vivo* by Using Transferrin Receptor Pathways. *Magn. Reson Med.* **40**: 236-242

**Kreuzig T**: Biochemie, *Junghohann Verlagsgesellschaft*, (1990).

**Lanza GM, Lamerichs R, Caruthers S and Wickline SA** (2003) Molekular Imaging in MR with targeted paramagnetic nanoparticles. *MedicaMundi* **47(1)**: 34-39

**Löffler G und Petriedes PE**: Biochemie und Pathobiochemie. *Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York*, (1998).

---

**Lottspeich F, Zorbas H:** Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin*, (1998).

**Lowenstam HA** (1962) Magnetite in denticle capping in recent chitons (Polyplacophora). *Bull Geol Soc Am* **73**: 435 - 438

**Madersbacher S and Marberger M** (1996) Minimal invasive therapy of benign prostatic hyperplasia. *Wien Med Wochenschrift* **146**: 169 - 175

**Martin CR, Mitchell DT** (1998) Nanomaterials in Analytical Chemistry. *Anal Chem* **70**: 322A-327A

**Massart R** (1981) Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans Magn* **17**: 1247-1275

**Matsunaga T and H Takeyama.** (1998). Biomagnetic nanoparticle formation and application. *Supramol. Sci.* **5**: 391 - 394

**Medicine - Worldwide** (2002) Hyperthermie. Web – Seite einsehbar in: [http://www.m-ww.de/enzyklopaedie/diagnosen\\_therapien/hyperthermie.html?page=2](http://www.m-ww.de/enzyklopaedie/diagnosen_therapien/hyperthermie.html?page=2),  
Besucht am: 19.10.2004

**Militello V, Casarino C, Emanuele A, Giostra A, Pullara F, Leone M** (2004) Aggregation kinetics of bovine serum albumin studied by FTIR spectroscopy and light scattering. *Biophys Chem* **107(2)**:175-187

**Molday RS, Mackenzie D** (1982) Immunospecific ferromagnetic iron dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. *J Immunol Methods* **52**:353-367

**Müller RH und Schuhmann R** (1997) Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis. *Stuttgart: WVG, Wiss. Verl. – Ges.:* 55 - 70

---

**Müller R** (2004) Persönliche Mitteilung, *Institut für Physikalische Hochtechnologie e.V. Jena*

**Moore A, Marecos E, Bogdanov and Weissleder R** (2000) Tumoral Distribution of Long-circulating Dextran-coated Iron Oxide Nanoparticles in a Rodent Model. *Radiology* **214**: 568-574

**Niemeyer CM** (2001) Nanoparticles, Proteins and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Material Science. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**: 4128-4158

**O'Connor CJ, Kolesnichenko V, Carpenter E, Sangregorio C, Zhou WL, Kumbhar A, Sims J, Agnoli F** (2001) Fabrication and Properties of Magnetic Particles with Nanometer Dimensions. *Synthetic Metals* **122(3)**: 547 - 557

**Odenbach S** (2003) Magnetic fluids-suspensions of magnetic dipoles and their magnetic control. *J. Phys.: Condens. Matter* **15**: 1497-1508

**Pardoe H, Chua-anusorn W, St. Pierre TG, and Dobson J** (2001) Structural and magnetic properties of nanoscale iron oxide particles synthesized in the presence of dextran and polyvinyl alcohol. *J. Magn. Magn. Mat.* **225**: 41-46

**Raj K, Moskowitz B and Casciari R** (1995) Advances on ferrofluid technology. *J Magn Mater* **149**: 174-180

**Remsen LG, McCormick CI, Roman Goldstein S, Nilaver Gajanan, Weissleder R et al.** (1996) MR of Carcinoma-Specific Monoclonal Antibody Conjugated to Monocrystalline Iron Oxide Nanoparticles: The Potential for Noninvasive Diagnosis. *AJNR AM J Neuroradiol* **17**: 411-418

**Rosensweig RE** (1982) Magnetische Flüssigkeiten. *Spektrum der Wissenschaft*, **Dez**: 88-98

**Šafařík I, Šafaříková M** (1999) Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *J Chromatogr B* **722**: 33-53

---

**Šafařík I, Šafaříková M** (2002) Invited Review Magnetic Nanoparticles Biosciences. *Monatshefte für Chemie* **133**: 737-759

**Schüler D and Frankel RB** (1999) Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**: 464-473

**Schulz O, Vogel E und Bernhardt JH** (1998) Neue Entwicklungen der Hyperthermie. *Deutsches Ärzteblatt* **95**: 1612 - 1615

**Seegenschmiedt MH, Klautke G, Walther E, Feldmann HJ, Katalinic A, Stuschke M, Lieven H and Vaupel P** (1996) Water filtered infrared – A – hyperthermia combined with radiotherapy for advanced and recurrent tumors. *Strahlenther Onkol* **172**: 475 - 484

**Seip CT, Carpenter EE, O'Connor CJ, John VT and Li S** (1998) Magnetic Properties of a Series of Ferrite Nanoparticles Synthesized in Reverse Micelles. *IEEE Transactions on Magnetics* **34**: 1111-1113

**Shen LF, Laibinis PE, Hatton TA** (1999) Aqueous Magnetic Fluids Stabilized by Surfactant Bilayers. *J Magn Magn Mater* **194**: 37-44

**Shen T, Weissleder R, Papisov M, Bogdanov jr. A, Brady TJ** (1993) Monocrystalline Iron Oxide Nanocompounds (MIONS) Physicochemical properties. *Magn Reson Med* **29**: 599-604

**Shinkai M, Suzuki M, Iijima S and Kobayashi T** (1994) Antibody-conjugated magnetoliposomes for targeting cancer cells and their application in hyperthermia. *Biotechnol. Appl, Biochem.* **21**: 125-137

**Sommerfeld P, Schroeder U, Sabel BA** (1997) Long-term stability PBCA nanoparticle suspensions suggest clinical usefulness. *International Journal of Pharmaceutics* **155 (2)**: 201-207

---

**Sommerfeld P, Sabel BA, Schroeder U** (2000) Long-term stability of PBCA nanoparticle suspensions. *Journal of microencapsulation* **17 (1)**: 69-79

**Sousa MH, Rubim JC, Sobrinho PG and Tourinho FA** (2001) Biocompatible magnetic fluid precursors based on aspartic and glutamic acid modified maghemite nanostructures. *J Magn Magn Mater* **225**: 67-72

**Stark DD, Weissleder R, Elizondo G et al.** (1988) Superparamagnetic iron oxid: clinical application as a contrast agent for MR imaging of the liver. *Radiology* **168**: 297-301

**Tartaj P, del Puerto Morales M, Veintemillas-Verdaguer sabino et al.** (2003) The preparation of magnetic Nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* **36**: R182-R197

**Tedder JM, Nechvatal A, Murray AW et al.** (1972) Amino – acids and proteins. *Basic organic chemistry* **6**: 305-342

**Tiefenauer LX, Kuhne G and Andes RY** (1993) Antibody magnetite nanoparticles— *in vitro* characterization of a potential tumor-specific contrast agent for magnetic resonance imaging. *Bioconjugate Chem* **4**: 347-352

**Torchilin VP** (2000) Drug targetting. *Eur J Pharm Sci* **11**: 81-91

**Vermeer AW, Norde W** (2000), The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophys J.* **78(1)**:394-404

**VDI Technologiezentrum** (2004), Nanobiotechnologie. Web – Seite vom:

19.10.2004, Einsehbar in:

<http://www.vdi.de/vdi/organisation/schnellauswahl/techno/arbeitsgebiete/fue/physik/02054/index.php>, Besucht am 19.10.2004

---

**Wang FH, Yoshitake T, Kim DK, Muhammed M, Bjelke B and Kehr J** (2003) Determination of conjugation efficiency of antibodies and proteins to the superparamagnetic iron oxide nanoparticles by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Nanoparticle Research* **5**: 137-146

**Weischedel U** (1987) Wirkungssteigerung der Strahlentherapie maligner Tumoren: Hyperthermie in Wirkungssteigerung der Strahlentherapie maligner Tumoren, ed. Karl zum Winkel, *Springer – Verlag, Berlin u. a.*: 176 - 184

**Widder KJ, Senyei AE** (1983) Magnetic microspheres: a vehicle for selective targeting of drugs. *Pharmacol Therapeut* **20**: 377-395

**Zhang CL, Vali H, Romanek CS, Phelps TJ, Liu SV** (1998) Formation of single-domain magnetite by a thermophilic bacterium. *Am Mineral* **83**: 1409 - 1418

**Zhao M, Kircher MF, Josephso L, Weissleder R** (2002) Differential Conjugation of Tat Peptide to Superparamagnetic Nanoparticles and its Effect on Cellular Uptake. *Bioconjugate Chem.* **13**: 840-844

**Zimmermann E, Muller RH** (2001) Electrolyte- and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions in artificial gastrointestinal media. *Eur J Pharm Biopharm* **52(2)**:203-210



---

## 10 Danksagung

### Mein besonderer Dank gilt:

- Frau **PD Dr. Ingrid Hilger**
- Herrn **Prof. Dr. med. Dipl. chem. Werner Kaiser**
- Den **Mitarbeitern der Arbeitsgemeinschaft experimentelle Radiologie**
- Herrn **Prof. Dr. Alfred Fahr**
- Den **Mitarbeitern des Institutes für Pharmazeutische Technologie**

---

## 11 Lebenslauf

### Timm Sakrzewa

<u>Persönliche Informationen</u>	Familienstand:	<i>Ledig</i>	Nationalität:	<i>Deutsch</i>
	Geburtsdatum:	<i>28.01.1977</i>	Geburtsort:	<i>Heilbronn</i>
	Eltern:	<i>Tuisko Sakrzewa; Heidrun Sakrzewa, geb. Berger</i>		
	Geschwister:	<i>Maike Sakrzewa; Thilo Sakrzewa</i>		

### Ausbildung

1983-1987	Samuel-Friedrich-Sauter Grundschule Flehingen (Baden-Württemberg)
1987-1988	Grund-und Hauptschule Oberderdingen (Baden-Württemberg)
1988-1992	Grund-und Hauptschule Güglingen (Baden-Württemberg)
1992-1994	2jährige Berufsfachschule Wilhelm-Maybach-Schule Heilbronn (Baden-Württemberg)
1994-1997	Technisches Gymnasium Wilhelm-Maybach-Schule Heilbronn (Baden-Württemberg)
1997-2002	Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Thüringen)
Dez. 2002	Staatsexamen
Jan. 2003	Bearbeitung eines Promotionsthemas am Institut für Medizinhistorie der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Thüringen)
Sep. 2003	Rückgabe des Promotionsthemas am Institut für Medizinhistorie der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Thüringen)
Ab Okt. 2003	Bearbeitung eines Promotionsthemas am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Thüringen)
Ab 15. Okt. 2004	Antritt einer Stelle als Vorbereitungsassistent

Kleingartach, den 17.04.2005

-Timm Sakrzewa-

---

## **12 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. Ingrid Hilger, Dr. Christine Fritsche.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde, und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Kleingartach, den 17.04.2005

-Timm Sakrzewa-